



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 A61K 45/06, 39/395 // 31/35, 31/40, 31/44</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/59636</p> <p>(43) 国際公開日 1999年11月25日(25.11.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/02660</p> <p>(22) 国際出願日 1999年5月20日(20.05.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/138999 1998年5月20日(20.05.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 協和醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP] 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 設楽研也(SHITARA, Kenya)[JP/JP] 〒251-0025 神奈川県藤沢市鶴沼石上2-1-19 Kanagawa, (JP) 佐藤靖史(SATO, Yasufumi)[JP/JP] 〒989-3201 宮城県仙台市青葉区国見ヶ丘2-12-4 Miyagi, (JP)</p>		<p>(81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, IN, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, US, VN, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: VEGF ACTIVITY INHIBITORS</p> <p>(54)発明の名称 VEGF活性阻害剤</p> <p>(57) Abstract Remedies having an enhanced efficacy against solid tumor, rheumatoid arthritis, diabetic retinopathy, premature retinopathy, psoriasis, etc. comprising a combination of a substance inhibiting signal transduction mediated by a human VEGF receptor Flt-1 with a substance inhibiting signal transduction mediated by a human VEGF receptor KDR, which are useful in diagnosing or treating diseases worsening with abnormal neovascularization, for example, proliferation or metastasis of solid tumor, arthritis in rheumatoid arthritis, diabetic retinopathy, premature retinopathy, psoriasis, etc.</p>		

## (57)要約

本発明は、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症および乾癬など血管新生の異常により病態が進行する疾患の診断あるいは治療に有用であるヒト VEGF 受容体 Flt-1 を介する情報伝達を阻害する物質とヒト VEGF 受容体 KDR を介する情報伝達を阻害する物質との組合せからなる、固形腫瘍、慢性関節リウマチ、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症および乾癬などのより効果的な治療剤を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	UD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	グレートブリテン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレンダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UA	ウクライナ
CH	スイス	IL	イスラエル	MW	マラウイ	UG	ウガンダ
CI	コートジボワール	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IS	アイスランド	NE	ニジェール	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IT	イタリア	NL	オランダ	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	JP	日本	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PL	ポーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ	KR	韓国	RO	ルーマニア		
DK	デンマーク						

## 明 細 書

### VEGF 活性阻害剤

#### 技術分野

本発明は、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を介する情報伝達を阻害する物質とヒト VEGF 受容体 KDR を介する情報伝達を阻害する物質との組合せからなり、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症および乾癬など血管新生の異常により病態が進行する疾患の治療に有用である薬剤に関する。

#### 背景技術

血管新生は、脊椎動物の胎生期における循環器系の形成や多くの組織の構築に重要な役割を果たすとともに、成熟個体(雌)においても性周期における黄体形成、子宮内膜の一過性の増殖、胎盤形成などに密接に関与する。さらに、病的状態としては、固形腫瘍の増殖、転移形成、糖尿病性網膜症、慢性関節リウマチの病態形成、促進に血管新生が深く関与している[J. Biol. Chem., 267, 10931 (1992)]。血管新生は、血管新生因子が分泌されることが引き金となり、近傍にある既存の血管の内皮細胞からプロテアーゼが分泌され、基底膜、間質が破壊され、続いて血管内皮細胞の遊走、増殖がはじまり、管腔が形成されることで血管が新生される過程よりなる[J. Biol. Chem., 267, 10931 (1992)]。血管新生を誘導する因子としては、Vascular permeability factor (VPF)/Vascular endothelial growth factor (VEGF)が上記発生段階における血管新生および病的な状態における血管新生において最も重要な因子として知られている[Advances in Cancer Research. 67, 281 (1995)]。VPF/VEGF はホモダイマーよりなる分子量約 4 万のタンパク質であり、1983 年に血管透過性促進因子(Vascular permeability factor: VPF)として[Science 219, 983 (1983)]、1989 年に血管内皮細胞増殖因子(Vascular endothelial growth factor: VEGF)として独立した分子として報告されたが[Biochem. Biophys. Res. Comm., 161, 851 (1989)]、cDNA クローニングの結果、両者は同一の物質であることが明らかとなった[Science, 246, 1306

(1989); Science, 246, 1309 (1989)] (以下 VEGF と記載)。VEGF の活性としてはこれまでに、血管内皮細胞に対し、増殖促進活性(ED50 = 2-3 pM) [Biochem. Biophys. Res. Comm., 161, 851 (1989)]、遊走促進活性[J. Immunology, 152, 4149(1994)]、マトロプロテアーゼ分泌促進活性[J. Cell Physiol., 153, 557 (1992)]、ウロキナーゼ、tPA 分泌促進活性[Biochem. Biophys. Res. Comm., 181, 902 (1991)]、転写因子 ETS-1 の発現促進活性[J. Cell. Physiol. 169, 522 (1996)]、インテグリン  $\alpha v \beta 3$  の発現上昇活性[American J. Pathology, 149, 293 (1996)]等を示し、in vivo においては血管新生促進活性[Circulation, 92 suppl II, 365 (1995)]、血管透過性促進活性[Science, 219, 983 (1983)]が報告されている。VEGF は血管内皮細胞に極めて特異性の高い増殖因子であることが報告されている[Biochem. Biophys. Res. Comm., 161, 851 (1989)]。VEGF には Alternative splicing により 4 種類のタンパク質が存在することが報告されている[J. Biol. Chem., 267, 26031 (1991)]。

血管新生を伴う疾患の中で、固形腫瘍の増殖、転移形成、糖尿病性網膜症、慢性関節リュウマチの病態形成に VEGF が深く関与していることが報告されている。固形腫瘍については、これまでに腎癌[Cancer Research, 54, 4233 (1994)]、乳癌[Human Pathology, 26, 86 (1995)]、脳腫瘍[J. Clinical Investigation, 91, 153 (1993)]、消化器癌[Cancer Research, 53, 4727 (1993)]、卵巣癌[Cancer Research, 54, 276 (1994)]などの多くのヒト腫瘍組織において VEGF が産生されていることが報告されている。乳癌については VEGF と患者の予後との関係が検討された結果、VEGF 高発現腫瘍は、低発現腫瘍に比べ、腫瘍血管新生が盛んであり生存率が低いことが明らかとなっている[Japanese J. Cancer Research, 85, 1045 (1994)]。また、ヌードマウスにヒト腫瘍を皮下移植したゼノグラフトモデル実験系において、抗 VEGF モノクローナル抗体 A4.6.1 は腫瘍増殖抑制効果を示すことが報告されている[Nature, 362, 841 (1993)]。さらに、ヌードマウスにおけるヒト腫瘍の転移癌モデルにおいて、抗 VEGF モノクローナル抗体 A4.6.1 は癌転移を抑制できる

ことが報告されている[Cancer Research, 56, 921 (1996)]。従って、VEGF 活性を抑制することができれば癌患者における腫瘍の増殖、転移形成を抑制できるものと期待される。また、ヒトの癌性胸水、腹水中に高濃度の VEGF が検出されることから、胸水、腹水貯留の主要な因子である可能性も示され [Biochimica et Biophysica Acta, 1221, 211 (1994)]、VEGF をブロックすることで癌性胸水、腹水の貯留を防ぐことも期待される。

糖尿病網膜症においては、異常な血管新生により網膜剥離や硝子体出血をおこして失明にいたるが、糖尿病性網膜症における血管新生と患者眼球内の VEGF レベルが正相関することが報告されている[New England J. Medicine, 331, 1480 (1994)]。また、サル の 網 膜 症 モデルにおいて抗 VEGF 中モノクローナル抗体 A4.6.1 の眼内投与により VEGF 活性を抑制すると血管新生が抑制されることが報告されている[Arch Ophthalmol. 114, 66 (1996)]。従って、過剰に産生される VEGF 活性を抑制することで糖尿病性網膜症における血管新生を抑制できることが期待される。

慢性関節リウマチの関節炎の病態の進行(骨、軟骨の破壊)には血管新生を伴うが、慢性関節リウマチ患者の関節液中には VEGF が高濃度で含まれていること、関節中のマクロファージが VEGF を産生することが報告されている[Journal of Immunology, 152, 4149 (1994)、J. Experimental Medicine, 180, 341 (1994)]。過剰に産生される VEGF 活性を抑制することで関節炎における血管新生を抑制できることが期待される。

ヒトの VEGF 受容体としてはこれまでに受容体型チロシンキナーゼファミリーに属する第 1 の受容体である Flt-1(fms-like tyrosine kinase)[Oncogene, 5, 519 (1990)、Science, 255, 989 (1992)]および第 2 の受容体である KDR(kinase insert domain-containing receptor)[WO92/14748、Biochem. Biophys. Res. Comm., 187, 1579 (1992)]の 2 種が報告されている。ヒト型 VEGF 受容体 KDR のマウス型ホモログは Flk-1[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 9026 (1991)、WO94/11499、Cell, 72, 835 (1993)]と命名されている。Flt-1 および KDR/Flk-1 の細胞外ドメインは 7 個のイムノグロブリン様ド

メインよりなり、細胞内ドメインにはチロシンキナーゼドメインを有する分子量 180～200 キロダルトンの膜タンパク質である。VEGF は Flt-1 および KDR/Flk-1 にはそれぞれ KD 値が 20 pM および 75 pM で特異的に結合する。Flt-1 および KDR/Flk-1 は血管内皮細胞に特異的に発現していると報告されている[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 7533 (1993)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 8915 (1993)]。

Flt-1 の様々な疾患における発現については、ヒトグリオブラストーマ組織の腫瘍血管内皮細胞[Nature, 359, 845 (1992)]、ヒト消化器癌組織の腫瘍血管内皮細胞[Cancer Research, 53, 4727 (1993)]で、正常組織の血管内皮細胞に比べ flt-1 mRNA の発現が上昇していることが報告されている。さらに、慢性関節リュウマチ患者の関節の血管内皮細胞においてもイン・サイチュ・ハイブリダイゼーション(in situ hybridization)により flt-1 mRNA の発現が認められることが報告されている[J. Experimental Medicine, 180, 341 (1994)]。これらの結果は、腫瘍血管新生において VEGF-VEGF 受容体 Flt-1 系が重要な役割を果たしていることを強く示唆するものである。Flt-1 は VEGF が結合すること、細胞内ドメインが自己リン酸化されることが報告されているが[Science, 255, 989 (1992)]、詳しい機能については不明である。しかし、flt-1 遺伝子を破壊した flt-1 ノックアウトマウスは発生初期の血島形成や、それに続く血管新生において、血管内皮細胞の形態異常により血管構築が異常となり胎生 8.5～9.5 日齢で死亡することから、Flt-1 は血管新生における血管内皮細胞の管腔形成に必須の機能を果たしていると推定されている[Nature, 376, 66 (1995)]。

一方、様々なヒトの疾患における KDR の発現については、ヒト脳腫瘍組織の腫瘍血管内皮細胞[American J. Pathology, 146, 368 (1995)]、ヒト消化器癌組織の腫瘍血管内皮細胞[Cancer Research, 53, 4727 (1993)]においては正常組織の血管内皮細胞に比べ KDR の mRNA レベルの発現が上昇していることが報告されている。これらの結果は、腫瘍血管新生において VEGF-VEGF 受容体 KDR 系が重要な役割を果たしていることを強く示唆するものである。さらに、慢性関節リュウマチ患者の関節の血管内皮細胞においても in

situ hybridization により KDR mRNA の発現が認められることが報告されており[J. Experimental Medicine, 180, 341 (1994)]、VEGF-VEGF 受容体 KDR 系の重要性を示唆している。VEGF 受容体 KDR/Flk-1 の機能については、ブタ動脈の血管内皮細胞に KDR を発現させると VEGF に反応し増殖、遊走することから、VEGF の多様な活性の中で KDR は血管内皮細胞の増殖に関与すると報告されている[J. Biol. Chem., 269, 26988 (1994)]。また、マウス型 flk-1 遺伝子を破壊した flk-1 ノックアウトマウスは成熟した血管内皮細胞が全く認められず、卵黄囊の血島も形成されず、子宮内で死亡したことから、動物個体においても KDR/Flk-1 は血管内皮細胞の増殖、分化に関与することが報告されている[Nature, 376, 62 (1995)]。

以上のように、VEGF の多彩な機能の中で、血管内皮細胞の増殖は KDR により、管腔形成は Flt-1 により担われていると推定されるが、血管透過性の亢進、プロテアーゼ産生促進等の他の VEGF の作用はどちらの受容体により媒介されるか不明である。flt-1 ノックアウトマウスと KDR/flk-1 ノックアウトマウスにおいて認められる血管形成異常が全くことなることから、2 つの受容体を同時にブロックすればより効果的に血管新生を阻害できるものと推定される。

血管内皮細胞において KDR/Flk-1 および Flt-1 の発現を抑制させることができる抗 KDR/Flk-1 リボザイム(Ribozyme)および抗 Flt-1 リボザイムはヒト皮膚の微小血管内皮細胞 HMVEC の VEGF 依存的増殖を抑制できるがそれぞれ部分的な抑制であり、抗 KDR/Flk-1 リボザイムおよび抗 Flt-1 リボザイムを同時に添加し、2 つの受容体の発現を同時に抑制するとより強い増殖阻害効果が認められたと報告されている(WO 97/15662)。

以上のことから、2 つの VEGF 受容体 KDR 及び Flt-1 に対するモノクローナル抗体を併用し、KDR 及び Flt-1 の機能を阻害することにより VEGF の多彩な生物活性を阻害する方法は、ヒトにおける固形腫瘍の増殖、転移形成、慢性関節リュウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬など異常な血管新生により病態が進行する疾患の治療に有用であることが期待される。しかしながら、2 つの VEGF 受容体 KDR 及び Flt-1 に対するモノクロ

ーナル抗体の併用効果の有効性についてはこれまで報告されていない。

### 発明の開示

固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リュウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症あるいは乾癬など異常な血管新生により病態が進行する疾患を治療するための有用な方法が求められている。これまで抗 VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体の報告はあるが(演題番号 A-52, Angiogenesis and Cancer, AACR Special Conference in Cancer Research, 1998 年 1 月 25 日)、KDR のみを阻害しても多彩な VEGF の作用を完全には阻害できない。従って、VEGF の多彩な生物活性を効果的に阻害する薬剤の開発が望まれている。

本発明は、以下の(1)～(14)に関する。

(1) ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を介する情報伝達を阻害する物質とヒト VEGF 受容体 KDR を介する情報伝達を阻害する物質との組み合わせからなる医薬。

受容体を介する情報伝達を阻害する物質は、リガンドの受容体結合を阻害する物質、または受容体からの情報伝達を阻害する物質などを包含する。

組み合わせからなる医薬は、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を介する情報伝達を阻害する物質とヒト VEGF 受容体 KDR を介する情報伝達を阻害する物質とを含む医薬、またはヒト VEGF 受容体 Flt-1 を介する情報伝達を阻害する物質とヒト VEGF 受容体 KDR を介する情報伝達を阻害する物質とを投与時に同時に用いる医薬のいずれでもよい。

ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を介する情報伝達を阻害する物質としては、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を介する情報伝達を阻害する作用があればいずれでもよいが、例えば、中和活性を有する抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体、または SB203580 [Oncogene, 15, 2169 (1997)] などの p38 阻害剤などをあげることができる。

ヒト VEGF 受容体 KDR を介する情報伝達を阻害する物質としては、ヒト VEGF 受容体 KDR を介する情報伝達を阻害する作用があればいずれでもよいが、例えば、中和活性を有する抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗



体、または SU5416[Cancer Research, 59, 99 (1999)]などの KDR チロシンキナーゼ阻害剤、PD98059[Journal of Biological Chemistry, 270, 27489 (1995)]などの MEK 1阻害により ERK を阻害する薬剤などをあげることができる。

(2) ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を介する情報伝達を阻害する物質とヒト VEGF 受容体 KDR を介する情報伝達を阻害する物質との組み合わせからなる VEGF 活性阻害剤。

(3) ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を介する情報伝達を阻害する物質とヒト VEGF 受容体 KDR を介する情報伝達を阻害する物質との組み合わせからなる血管新生阻害剤。

(4) ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を介する情報伝達を阻害する物質とヒト VEGF 受容体 KDR を介する情報伝達を阻害する物質との組み合わせからなる異常な血管新生により病態が進行する疾患の治療薬。

(5) 異常な血管新生により病態が進行する疾患が、固形腫瘍の増殖、転移形成、慢性関節リュウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬である上記(4)記載の治療薬。

(6) ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を介する情報伝達を阻害する物質が、VEGF の Flt-1 受容体結合を阻害する物質、または Flt-1 受容体からの情報伝達を阻害する物質である上記(1)～(5)から選ばれる薬剤。

(7) VEGF の Flt-1 受容体結合を阻害する物質が、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に対するモノクローナル抗体および該抗体断片から選ばれる上記(6)記載の薬剤。

(8) ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に対するモノクローナル抗体が、ハイブリドーマ KM1750(FERM BP-5700)の生産するマウス IgG2b サブクラスに属するモノクローナル抗体、またはハイブリドーマ KM1732(FERM BP-5698)の生産するマウス IgG1 サブクラスに属するモノクローナル抗体である上記(7)記載の薬剤。

(9) Flt-1 受容体からの情報伝達を阻害する物質が、Flt-1 チロシンキナーゼ阻害活性を有する物質および p38 阻害活性を有する物質から選ばれる上記

(6) 記載の薬剤。

(10) ヒト VEGF 受容体 KDR を介する情報伝達を阻害する物質が、VEGF の KDR 受容体結合を阻害する物質、または KDR 受容体からの情報伝達を阻害する物質である上記 (1) ~ (5) から選ばれる薬剤。

(11) VEGF の KDR 受容体結合を阻害する物質が、ヒト VEGF 受容体 KDR に対するモノクローナル抗体および該抗体断片から選ばれる上記 (10) に記載の薬剤。

(12) ヒト VEGF 受容体 KDR に対するモノクローナル抗体が、ハイブリドーマ KM1992(FERM BP-6217)の生産するマウス IgG1 サブクラスに属するモノクローナル抗体、またはハイブリドーマ KM1995(FERM BP-6218)の生産するマウス IgG2b サブクラスに属するモノクローナル抗体である上記 (11) に記載の薬剤。

(13) KDR 受容体からの情報伝達を阻害する物質が、KDR チロシンキナーゼ阻害活性を有する物質および ERK 阻害活性を有する物質から選ばれる上記 (10) 記載の薬剤。

(14) ヒト VEGF 受容体 Flt-1 アンタゴニストとヒト VEGF 受容体 KDR アンタゴニストとを含む医薬。

受容体アンタゴニストとは受容体の機能を阻害する物質を意味し、受容体の機能を阻害することができれば低分子、高分子のいずれでもよい。例えば、リガンドの受容体への結合を阻害する物質、好ましくは中和抗体、あるいは、受容体を介するシグナル伝達を阻害する物質 (以下、シグナル阻害とも記す) 等があげられる。

本発明者らは、VEGF 受容体 KDR に対するモノクローナル抗体により阻害される VEGF の生物活性と VEGF 受容体 Flt-1 に対するモノクローナル抗体により阻害される VEGF の生物活性が異なることを見だし、さらに、2 つの VEGF 受容体 KDR 及び Flt-1 に対するモノクローナル抗体を組み合わせ使用し、KDR 及び Flt-1 の機能を阻害することにより VEGF の多彩な生物活性を効果的に阻害できること、また、予想外の効果として、2 つの VEGF 受容

体 KDR 及び Flt-1 に対するモノクローナル抗体を組み合わせて使用すると VEGF のいくつかの生物活性の抑制について相乗作用が認められることを見出した。したがって、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を介する情報伝達を阻害する物質とヒト VEGF 受容体 KDR を介する情報伝達を阻害する物質とを組み合わせることにより、前記固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リュウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症および乾癬など血管新生の異常により病態が進行する疾患の治療をより効果的に行うことができる。

本発明で使用される物質は、VEGF 受容体 Flt-1 (以下、単に Flt-1 と記す) を介する情報伝達を阻害する物質および VEGF 受容体 KDR (以下、単に KDR と記す) を介する情報伝達を阻害する物質であれば、いかなるものでもよい。

Flt-1 を介する情報伝達を阻害する物質としては、Flt-1 の機能を阻害できる物質であればいかなるものでもよいが、VEGF が Flt-1 に結合するのを阻害する抗 Flt-1 モノクローナル抗体、該抗体断片および可溶性 Flt-1、あるいは、Flt-1 のシグナル伝達を阻害するチロシンキナーゼ阻害剤、SB203580 [Oncogene, 15, 2169 (1997)] のような p38 阻害剤などがあげられる。

KDR を介する情報伝達を阻害する物質としては、KDR の機能を阻害できる物質であればいかなるものでもよいが、VEGF が KDR に結合するのを阻害する抗 KDR モノクローナル抗体、該抗体断片および可溶性 KDR、あるいは、KDR のシグナル伝達を阻害する SU5416 のようなチロシンキナーゼ阻害剤 [Cancer Research, 59, 99 (1999)]、PD98059 [Journal of Biological Chemistry, 270, 27489 (1995)] のような ERK (extracellular signal-regulated protein kinase の略) アクチベーターである MEK1 [MAP (mitogen-activated protein の略) kinase kinase の略] 阻害剤などがあげられる。

モノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより生産された抗体および、抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した形質転換体により生産される遺伝子組換え抗体をあげることができる。

遺伝子組換え抗体としては、ヒト化抗体、ならびに一本鎖抗体およびジスルフ

イド安定化抗体などの抗体断片など、遺伝子組換えにより製造される抗体を包含する。遺伝子組換え抗体において、モノクローナル抗体の特徴を有し、抗原性が低く、血中半減期が延長されたものが好ましく用いられる。

本発明に使用するヒト化抗体は、ヒト型キメラ抗体およびヒト型 CDR 移植抗体を包含する。

本発明に使用する抗体断片は、Flt-1 または KDR に特異的に反応する抗体断片である Fab(Fragment of antigen binding の略)、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖抗体(single chain Fv; 以下、scFv と称す) およびジスルフィド安定化抗体(disulfide stabilized Fv; 以下、dsFv と称す)を包含する。

また、抗体断片には、上記抗体の抗体可変領域(V 領域とも称す)重鎖(H 鎖とも称す)(以下、抗体可変領域重鎖を VH と称す)および抗体 V 領域軽鎖(L 鎖とも称す)(以下、抗体可変領域軽鎖を VL と称す)の相補性決定領域(complementary determining region; 以下、CDR と称す)のアミノ酸配列から選ばれるペプチドも包含する。

ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体可変領域重鎖および可変領域軽鎖とヒト抗体の定常領域重鎖(以下、CH と称す)およびヒト抗体の定常領域軽鎖(以下、CL と称す)とからなる抗体を意味する。

本発明に使用するヒト型キメラ抗体は、Flt-1 または KDR に特異的に反応するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマより、VH および VL をコードする cDNA を取得し、ヒト抗体 CH およびヒト抗体 CL をコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ製造することができる。

本発明に使用するヒト型キメラ抗体の構造としては、いずれのイムノグロブリン(Ig)クラスに属するものでもよいが、IgG 型、さらには IgG 型に属する IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 等のイムノグロブリンの C 領域が好ましい。

ヒト型 CDR 移植抗体は、ヒト抗体の VH および VL の CDR をヒト以外の動物の抗体の CDR 配列でそれぞれ置換した抗体を意味する。

本発明に使用するヒト型 CDR 移植抗体は、Flt-1 または KDR に特異的に反

応する、ヒト以外の動物の抗体の VH および VL の CDR 配列で任意のヒト抗体の VH および VL の CDR 配列をそれぞれ置換した V 領域をコードする cDNA を構築し、ヒト抗体の CH およびヒト抗体の CL をコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型 CDR 移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入し、発現させることにより製造することができる。

本発明に使用するヒト型 CDR 移植抗体 C 領域の構造としては、いずれのイムノグロブリン(Ig)クラスに属するものでもよいが、IgG 型、さらに IgG 型に属する IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 等のイムノグロブリンの C 領域が好ましい。

Fab は、IgGのヒンジ領域で2本の H 鎖を架橋している2つのジスルフィド結合の上部のペプチド部分を酵素パパインで分解して得られた、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体で構成された、分子量約 5 万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

本発明に使用する Fab は、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応する抗体をパパイン処理して得ることができる。または、該抗体の Fab 断片をコードする DNA を動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、Fab を製造することができる。

Fab'は、上記 F(ab')<sub>2</sub> のヒンジ間のジスルフィド結合を切断した分子量約 5 万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

本発明に使用する Fab'は、Flt-1 または KDR に特異的に反応する抗体を還元剤ジチオスレイトール処理して得ることができる。または、該抗体の Fab'断片をコードする DNA を動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞へ導入することにより発現させ、Fab'を製造することができる。

F(ab')<sub>2</sub> は、IgGのヒンジ領域の2個のジスルフィド結合の下部を酵素トリプシンで分解して得られた、2つの Fab 領域がヒンジ部分で結合して構成された、分子量約 10 万の抗原結合活性を有するフラグメントである。

本発明に使用する F(ab')<sub>2</sub> は、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に反応する抗体をトリプシン処理して得ることができる。または、該抗体の F(ab')<sub>2</sub> 断片をコードする DNA を動物細胞用発現ベクターに挿入し、該ベクターを動物細胞へ

導入することにより発現させ、 $F(ab')_2$  を製造することができる。

一本鎖抗体(scFv)は、一本の VH と一本の VL とを適当なペプチドリinker (以下、Lと称す)を用いて連結した、VH-L-VL ないしは VL-L-VH ポリペプチドを示す。本発明で使用される scFv に含まれる VH および VL は、本発明のモノクローナル抗体あるいはヒト型 CDR 移植抗体のいずれをも用いることができる。

本発明に使用する一本鎖抗体は、Flt-1 または KDR に特異的に反応する抗体を生産するハイブリドーマより VH および VL をコードする cDNA を取得し、一本鎖抗体発現ベクターを構築したのち該 cDNA を挿入し、大腸菌、酵母、あるいは動物細胞へ該発現ベクターを導入することにより発現させ製造することができる。

ジスルフィド安定化抗体(dsFv)は、VH および VL 中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドをジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は Reiter らにより示された方法[Protein Engineering, 7, 697 (1994)]に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。本発明のジスルフィド安定化抗体に含まれる VH あるいは VL はモノクローナル抗体あるいはヒト型 CDR 移植抗体のいずれをも用いることができる。

本発明に使用するジスルフィド安定化抗体は、Flt-1 または KDR に特異的に反応する抗体を生産するハイブリドーマより VH および VL をコードする cDNA を取得し、該 cDNA を適当な発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを大腸菌、酵母、あるいは動物細胞へ導入し発現させることにより製造することができる。

抗 Flt-1 モノクローナル抗体の具体例としては、ハイブリドーマ KM1732(FERM BP-5698) が生産するマウス IgG1 サブクラスに属するモノクローナル抗体 KM1732、および、ハイブリドーマ KM1750(FERM BP-5700)が生産するマウス IgG2b サブクラスに属するモノクローナル抗体 KM1750 があげられる。また、抗 KDR モノクローナル抗体の具体例としては、ハイブリドーマ KM1992(FERM BP-6217) が生産するマウス IgG1 サブクラスに属するモノク

ローナル抗体 KM1992、および、ハイブリドーマ KM1995(FERM BP-6218)が生産するマウス IgG2b サブクラスに属するモノクローナル抗体 KM1995 があげられる。ハイブリドーマ株 KM1732 および KM1750 は、平成8年10月8日付で、それぞれ工業技術院生命工学工業技術研究所に、FERM BP-5698 および FERM BP-5700 として寄託されている。ハイブリドーマ株 KM1992 および KM1995 は、平成 10 年1月8日付で、それぞれ工業技術院生命工学工業技術研究所に、FERM BP-6217 および FERM BP-6218 として寄託されている。

以下に本発明を構成する KDR を介する情報伝達を阻害する物質である抗 KDR 抗体および Flt-1 を介する情報伝達を阻害する物質である抗 Flt-1 抗体の製造法、ならびにそれらの物質を含む医薬の用途について説明する。

#### 1. 抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体および抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体の製造法

##### (1) 抗原の調製

抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体および抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体を作製するために必要な抗原としては、ヒト VEGF 受容体 KDR および抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 抗体を細胞表面に発現した細胞あるいはその細胞膜画分、または、長さの異なる細胞外領域を有する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 蛋白質および可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 蛋白質あるいは該蛋白質と抗体のFc部分との融合蛋白質などを用いることができる。

ヒト VEGF 受容体 KDR およびヒト VEGF 受容体 Flt-1 を細胞表面に発現する細胞としては、NIH3T3-KDR 細胞および NIH3T3-Flt-1 細胞[Cell Growth & Differentiation, 7, 213 (1996)]があげられる。長さの異なる細胞外領域を有する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 蛋白質および可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 蛋白質あるいは該蛋白質と抗体のFc部分との融合蛋白質として発現させる方法としては、ヒト VEGF 受容体 KDR およびヒト VEGF 受容体 Flt-1 をコードする全長あるいはその部分断片 cDNA[Cell Growth & Differentiation, 7, 213 (1996)][Oncogene, 5, 519 (1990)]を適当なベクターのプロモーター下流に挿入した組み換え体ベクターを造成し、それを宿主

細胞に導入することにより得られたヒト VEGF 受容体 KDR 発現細胞およびヒト VEGF 受容体 Flt-1 発現細胞を、適当な培地中で培養することにより細胞内あるいは培養上清中にヒト VEGF 受容体 KDR およびヒト VEGF 受容体 Flt-1 の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として生産することができる。

宿主としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞など、目的とする遺伝子を発現できるものであれば、いずれでもよい。細菌としては、エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*)、バチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) 等のエシェリヒア属、バチルス属細菌等が例示される。酵母としては、サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) 等が例示される。動物細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ細胞、サルの細胞である COS 細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞である CHO 細胞等が例示される。昆虫細胞としては、Sf9、Sf21 (ファーマンジェン社製)、High Five (インビトロジェン社製) 等が例示される。

本発明の DNA を導入するベクターとしては、該 DNA を組み込むことができ、宿主細胞で発現できるものであればいかなるベクターでも用いることができる。

細菌、例えばエシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) を宿主として用いる場合の発現ベクターとしては、プロモーター、リボゾーム結合配列、目的遺伝子をコードする DNA、転写終結配列、場合によってはプロモーターの制御配列より構成されているのが好ましいが、例えば、市販の pGEX (ファルマシア社製)、pET システム (ノバジェン社製) などが例示される。

細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌に DNA を導入する方法であれば、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭 63-248394) 等、いずれの方法も用いられる。

酵母を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEpl3 (ATCC37115)、YEpl24 (ATCC37051)、YCpl50 (ATCC37419) 等が用いられる。



酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法[Methods. Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 1929 (1978) ]、酢酸リチウム法[J. Bacteriol., 153, 163 (1983)]等、いずれの方法も用いられる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pAGE 107[特開平 3-22979 、Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAGE103[J. Biochem., 101, 1307 (1987) ]等が用いられる。

プロモーターとしては、動物細胞中で発現できるものであればいかなるものを用いてもよいが、例えば、サイトメガロウィルス(CMV)のIE(immediate early)遺伝子のプロモーター、SV40 あるいはメタロチオネインのプロモーター等があげられる。また、ヒトCMVの IE 遺伝子のエンハンサーをプロモーターとともに用いてもよい。

動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であれば、例えば、エレクトロポレーション法[Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法(特開平 2-227075)、リポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)]等、いずれの方法も用いられる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えばカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、サプPLEMENT 1～34(Current Protocols in Molecular Biology, supplement 1-34)、バキュロウィルス・イクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニユアル(Baculovirus expression vectors, a laboratory manual)等に記載された方法によって、タンパク質を発現することができる。すなわち、以下に述べる組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウィルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウィルスを得たのち、さらに組換えウィルスを昆虫細胞に感染させ、タンパク質発現昆虫細胞を取得する。

遺伝子導入ベクターとしては、例えば、p VL1392、pVL1393 、pBlueBacIII

(ともにインビトロジェン社製)等が用いられる。

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスである  
アウトグラファ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス

(*Autographa californica nuclear polyhedrosis virus*) などが用いられる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法(特開平 2-227075)、リポフェクション法[*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 7413 (1987)]等が用いられる。

また、ファーマンジェン社製バキュロゴールドスターキットなどを用いて組み換えバキュロウイルスを作製したのち、前述したSf9、Sf21あるいはHigh Five等の昆虫細胞に該組み換えウイルスを感染させることにより蛋白質を生産させることもできる[Bio/Technology, 10, 457 (1988)]。

遺伝子の発現方法としては、直接発現以外に、分泌生産、融合蛋白質発現等が開発されており、いずれの方法も用いることができる。例えば、モレキュラー・クローニング第2版[Molecular Cloning 2nd edition, Cold Spring Harbor Lab. Press New York (1989)]に記載されている方法に準じて行うことができる。

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、ヒト VEGF 受容体 KDR およびヒト VEGF 受容体 Flt-1 の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として製造することができる。

本発明の形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

大腸菌あるいは酵母等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、微生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい[モレキュラー・クローニング 第2版、コールドスプリングハーバーラボ・プレス(Molecular Cloning 2nd edition, Cold Spring Harbor

Lab.Press) New York(1989) ]。培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養などの好氣的条件下、15～40℃で16～96時間行う。培養期間中、pHは3.0～9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニアなどを用いて行う。培養中は必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI1640培地、EagleのMEM培地またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等が用いられる。培養は、通常5%CO<sub>2</sub>存在下、35～37℃で3～7日間行い、培養中は必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM-FH培地[ファーミンジェン(Pharmingen)社製]、Sf9001ISFM[ライフテクノロジーズ(Life Technologies)社製]、ExCell400、ExCell405 [いずれもJRH バイオサイエンス(JRH Biosciences)社製]等が用いられる。培養は、25～30℃で1～4日間行い、培養中は必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

動物細胞および昆虫細胞の培地中に血清が含有されているが、ヒトVEGF受容体KDRおよびヒトVEGF受容体Flt-1の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として精製することを容易にするため、好ましくは血清無添加の培地を用いる。

ヒトVEGF受容体KDRおよびヒトVEGF受容体Flt-1の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として宿主細胞内に蓄積された場合には、培養終了後、細胞を遠心分離し、水系緩衝液にけん濁後、超音波法、フレンチプレス法などにより細胞を破碎し、その遠心分離上清に該蛋白質を回収する。

さらに、細胞内に不溶体を形成した場合には、不溶体をタンパク質変性剤で可溶化後、タンパク質変性剤を含まないあるいはタンパク質変性剤の濃度がタンパク質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、或いは透析し、タンパク質の立体構造を形成させることができる。

ヒト VEGF 受容体 KDR およびヒト VEGF 受容体 Flt-1 の全長あるいは部分断片をそのままあるいは融合蛋白質として細胞外に分泌された場合には、培養上清中に発現蛋白質を回収することができる。単離精製については、溶媒抽出、有機溶媒による分別沈殿、塩析、透析、遠心分離、限外ろ過、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、結晶化、電気泳動などの分離操作を単独あるいは組み合わせて行うことができる。

## (2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

免疫に用いる動物としては、マウス、ラット、ハムスター、ラビットなどハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものでもよいが、本発明においてはマウスおよびラットを用いる例を説明する。3～20週令のマウスまたはラットに、上記1(1)で得られた該蛋白質を抗原として免疫し、その動物の脾、リンパ節、末梢血より抗体産生細胞を採取する。免疫は、動物の皮下、静脈内または腹腔内に、適当なアジュバントとともに抗原を数回投与することにより行う。アジュバントとしては、フロインドの完全アジュバント(Complete Freund's Adjuvant)または、水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなどがあげられる。各投与後 3～7 日目に免疫動物の眼底静脈叢あるいは尾静脈より採血し、抗原として用いた可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR およびヒト VEGF 受容体 Flt-1 あるいはヒト VEGF 受容体 KDR およびヒト VEGF 受容体 Flt-1 を細胞表面に発現している NIH3T3 細胞に対しての反応性について、酵素免疫測定法などで確認し[酵素免疫測定法(ELISA 法):医学書院刊(1976年)]、その血清が十分な抗体価を示したマウスまたはラットを抗体産生細胞の供給源とする。抗原物質の最終投与後 3～7 日目に、免疫したマウスより公知の方法[アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル、コールド・スプリングハーバー・ラボラトリー (Antibodies-A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)、以下、アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアルと記す]に準じて脾臓を摘出し、脾細胞と骨髓腫細胞とを融合させる。

## (3) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞である、8-アザグアニン耐性マウス(BALB/c 由来)骨髓腫細胞株 P3-X63Ag8-U1(P3-U1) [Eur. J. Immunol., 6, 511 (1976) ], SP2/0-Ag14(SP-2)[Nature, 276, 269 (1978) ], P3-X63-Ag8653(653)[J. Immunol., 123, 1548 (1979)], P3-X63-Ag8(X63) [Nature, 256, 495 (1975) ]など、イン・ビトロ(in vitro)で増殖可能な骨髓腫細胞であればいかなるものでもよい。これらの細胞株の培養および継代については公知の方法(アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル)に従い、細胞融合時までには  $2 \times 10^7$  個以上の細胞数を確保する。

#### (4) 細胞融合

(2) で得られた抗体産生細胞と(3) で得られた骨髓腫細胞とを洗浄したのち、ポリエチレングライコール-1000(PEG-1000)などの細胞凝集性媒体を加え、細胞を融合させ、培地中に懸濁させる。細胞の洗浄にはMEM培地またはPBS(リン酸二ナトリウム 1.83g、リン酸一カリウム 0.21g、食塩 7.65g、蒸留水 1 リットル、pH7.2 )などを用いる。また、融合細胞を懸濁させる培地としては、目的の融合細胞のみを選択的に得られるように、HAT 培地{正常培地[RPMI-1640 培地にグルタミン(1.5mM)、2-メルカプトエタノール( $5 \times 10^{-5}$ M)、ジェンタマイシン( $10 \mu\text{g/ml}$ ) および牛胎児血清(FCS) (CSL 社製、10%)を加えた培地]にヒポキサンチン( $10^{-4}$ M)、チミジン( $1.5 \times 10^{-5}$ M)およびアミノプテリン( $4 \times 10^{-7}$ M)を加えた培地}を用いる。

培養後、培養上清の一部をとり(5)に述べる酵素免疫測定法により、(1)で述べたヒト VEGF 受容体 KDR およびヒト VEGF 受容体 Flt-1 またはヒト VEGF 受容体 KDR およびヒト VEGF 受容体 Flt-1 との融合蛋白質などの組み換え蛋白質に特異的に反応する穴を選択する。ついで、限界希釈法によりクローニングを 2 回繰り返す[1 回目は、HT 培地(HAT 培地からアミノプテリンを除いた培地)、2 回目は、正常培地を使用する]、安定して強い抗体価の認められたものを抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体産生ハイブリドーマおよびヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株として選択する。

(5) 抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体およびヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体の選択

抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体およびヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの選択は、以下に述べる酵素免疫測定法により行う。

#### 酵素免疫測定法

抗原蛋白質あるいは抗原蛋白質を発現した細胞などを96ウェルプレートにコートし、ハイブリドーマ培養上清もしくは上述の方法で得られる精製抗体を第一抗体として反応させる。

第一抗体反応後、プレートを洗浄して第二抗体を添加する。

第二抗体とは、第一抗体のイムノグロブリンを認識できる抗体を、ビオチン、酵素、化学発光物質あるいは放射線化合物等で標識した抗体である。具体的にはハイブリドーマ作製の際にマウスを用いたのであれば、第二抗体としては、マウスイムノグロブリンを認識できる抗体を用いる。

反応後、第二抗体を標識した物質に応じた反応を行ない、抗原に特異的に反応するモノクローナル抗体を生産するハイブリドーマとして選択する。

#### (6) モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理[2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン(Pristane)0.5mlを腹腔内投与し、2週間飼育する]した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに、1(4)で得られた抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞  $2 \times 10^7 \sim 5 \times 10^6$  細胞/匹を腹腔内に注射する。10~21日間でハイブリドーマは腹水癌化する。該マウスまたはヌードマウスから腹水を採取し、遠心分離、40~50% 飽和硫酸アンモニウムによる塩析、カプリル酸沈殿法、DEAE- セファロースカラム、プロテインA- カラムあるいはセルロファイン GSL2000(生化学工業社製)のカラムなどを用いて、IgG あるいは IgM 画分を回収し、精製モノクローナル抗体とする。

精製モノクローナル抗体のサブクラスの決定は、マウスモノクローナル抗体タイピングキットまたはラットモノクローナル抗体タイピングキットなどを用いて行う

ことができる。蛋白質質量は、ローリー法あるいは 280nm での吸光度より算出することができる。

抗体のサブクラスとは、クラス内のアイソタイプのことで、マウスでは、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、ヒトでは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 があげられる。

マウス IgG1、IgG2a およびヒト IgG1 タイプは、補体依存性細胞傷害活性（以下、CDC 活性）および抗体依存性細胞傷害活性（以下、ADCC 活性）を有し、治療への応用上、有用である。

以下に 2 つの VEGF 受容体 KDR 及び Flt-1 に対するモノクローナル抗体を組み合わせ、KDR 及び Flt-1 の機能を阻害することにより VEGF の多彩な生物活性を阻害する方法について説明する。

VEGF の生物活性を測定する方法としては、血管内皮細胞の VEGF 依存的な増殖試験、遊走試験、および、チューブ形成試験「新生物化学実験講座 10 血管（内皮と平滑筋）」（東京化学同人、1991 年）などがあげられる。

VEGF 刺激による血管内皮細胞の活性化に伴い発現変動する遺伝子の解析方法としては、ノーザンブロット解析、RT-PCR 法「新細胞工学実験プロトコール 細胞工学 別冊 8（秀潤社、1993 年）」、インサイツハイブリダイゼーション法「改訂版 In situ ハイブリダイゼーション手法（学際企画、1992 年）」などがあげられる。

VEGF 刺激による血管内皮細胞の活性化に伴い発現変動する遺伝子としては、ets-1 [J. Cellular Physiology, 169, 522 (1996)], MMP-1 [J. Cellular Physiology, 169, 522 (1996)], flt-1 [Cancer Research, 57, 5421 (1997)] などがあげられる。

VEGF 刺激による血管内皮細胞の活性化に伴い発現変動するタンパク質の解析方法としては、免疫沈降法、ウエスタンブロット解析、免疫細胞染色法「単クローン抗体実験マニュアル（講談社サイエンティフィック、1987 年）」、「続生物化学実験講座 免疫生化学研究法（東京化学同人、1986 年）」、受容体の自己リン酸化測定法「続生物化学実験講座 情報伝達と細胞応答（東京化学同人、1986 年）」などがあげられる。

VEGF 刺激による血管内皮細胞の活性化に伴い発現変動する蛋白質としては p38 [Oncogene, 15, 2169 (1997)], ERK1 および ERK2 [Oncogene, 15, 2169- (1997)], JNK1 および JNK2 [Oncogene, 15, 2169 (1997)] 等があげられる。

2. Flt-1 を介する情報伝達を阻害する物質と KDR を介する情報伝達を阻害する物質を含む医薬の用途

本発明の Flt-1 を介する情報伝達を阻害する物質と KDR を介する情報伝達を阻害する物質を含む医薬とは、例えば、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体と抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体を含有する医薬、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体断片と抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体断片を含有する医薬、または、Flt-1 シグナル阻害剤と KDR シグナル阻害剤を含有する医薬などがあげられる。また、これら組成物は抗体、抗体断片または化学物質などの混合物であっても、2種類の抗体が結合しているバイスペシフィック抗体などの結合物であってもよい。

本発明の抗体を含有する医薬は、治療薬として単独で投与することも可能ではあるが、通常は薬理学的に許容される一つあるいはそれ以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野においてよく知られる任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが望ましく、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内および静脈内等の非経口投与をあげることができ、抗体製剤の場合、望ましくは静脈内投与をあげることができる。

投与形態としては、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、テープ剤等があげられる。

経口投与に適当な製剤としては、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等があげられる。

乳剤およびシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール、果糖等の糖類、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール等のグリコール類、ご



ま油、オリーブ油、大豆油等の油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類等の防腐剤、ストロベリーフレーバー、ペパーミント等のフレーバー類等を添加剤として用いて製造できる。

カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤等は、乳糖、ブドウ糖、ショ糖、マンニトール等の賦形剤、デンプン、アルギン酸ナトリウム等の崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム、タルク等の滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース、ゼラチン等の結合剤、脂肪酸エステル等の界面活性剤、グリセリン等の可塑剤等を添加剤として用いて製造できる。

非経口投与に適当な製剤としては、注射剤、座剤、噴霧剤等があげられる。

注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、あるいは両者の混合物からなる担体等を用いて調製する。

座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸等の担体を用いて調製される。

また、噴霧剤は該化合物そのもの、ないしは受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ該化合物を微細な粒子として分散させ吸収を容易にさせる担体等を用いて調製する。

担体として具体的には乳糖、グリセリン等が例示される。該化合物および用いる担体の性質により、エアロゾル、ドライパウダー等の製剤が可能である。また、これらの非経口剤においても経口剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

本医薬組成物の投与量は、患者の年齢、症状等によって異なるが、ヒトを含む哺乳動物に対し、各モノクローナル抗体として 0.1~20mg/kg/日投与する。投与は、各モノクローナル抗体を同時に投与する場合は、1 日 1 回(単回投与または連日投与)または間歇的に 1 週間に 1 ~3 回、2、3 週間に 1 回、別々に投与する場合は、各々のモノクローナル抗体を、適宜時間をおいて、1 日 1 回(単回投与または連日投与)または間歇的に 1 週間に 1~3 回、2、3 週間に 1 回静脈注射により行う。

本発明で示した 2 つの VEGF 受容体 KDR 及び Flt-1 に対するモノクローナル抗体を組み合わせての使用は、VEGF の多彩な生物活性を阻害し、さら

に相乗効果を示すことで、効率よく強力に血管新生異常疾患の治療に用いることができる。

#### 図面の簡単な説明

第1図 VEGF 依存的なヒト血管内皮細胞 HUVEC の増殖促進活性に及ぼす抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体の単独、併用効果を検討した結果を示す。

第2図 VEGF 依存的なヒト血管内皮細胞 HUVEC の遊走促進活性に及ぼす抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体の単独、併用効果を検討した結果を示す。

第3図 VEGF 依存的なヒト血管内皮細胞 HUVEC の遊走促進活性に及ぼす抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体の効果を検討した結果を示す。

第4図 ヒト血管内皮細胞 HUVEC おいて VEGF 刺激により発現変動する mRNA に及ぼす抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体の単独、併用効果を検討した結果を示す。

第5図 ヒト血管内皮細胞 HUVEC おいて VEGF 刺激により発現上昇する p38、ERK1、ERK2、JNK1 および JNK2 に及ぼす抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体の単独、併用効果を検討した結果を示す。

第6図 VEGF 刺激により大型化するヒト血管内皮細胞 HUVEC に及ぼす抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体の単独、併用効果を検討した結果を示す。

第7図 プラスミド pVL1393/Flt 3N の造成工程を示した図である。

第8図 プラスミド pVL1393/Flt 7N の造成工程を示した図である。

第9図 精製した Flt-1 7N および Flt-1 3N の SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (5~20%グラジエントゲルを使用) のパターンを示した図である。左より、分子量マーカー、Flt-1 3N、Flt-1 7N の泳動パターンをそれぞれ示す。還元条件下で電気泳動を行った。

第 10 図 プレートコートした可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N への  $^{125}\text{I}$ -ヒト VEGF の結合に及ぼす可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N の阻害効果を解析した結果を示す。

第 11 図 プラスミド pVL-KDR-7N-Fc の造成工程を示した図である。

第 12 図 可溶性 KDR-Fc 各種誘導体の模式図である。

第 13 図 可溶性 KDR 各種誘導体の模式図である。

第 14 図 精製した可溶性 KDR-Fc 各種誘導体の SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (5 ~ 20 % グラジエントゲルを使用) のパターンを示した図である。左より、KDR-1N-Fc、KDR-2N-Fc、KDR-3N-Fc、KDR-4N-Fc、KDR-5N-Fc、KDR-7N-Fc、KDR-2 $\Delta$ 1N-Fc、KDR-4 $\Delta$ 1N-Fc、KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc の泳動パターンをそれぞれ示す。還元条件下で電気泳動を行った。

第 15 図 A はプレートコートした可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N-Fc への  $^{125}\text{I}$ -ヒト VEGF の結合に及ぼす可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体の阻害効果を解析した結果を示す。B はプレートコートした可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体への  $^{125}\text{I}$ -ヒト VEGF の結合を解析した結果を示す。

第 16 図 ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体の可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体への結合活性を解析した結果を示す。

第 17 図 ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体のエピトープ部位を示す。

第 18 図 ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体の可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体への結合活性を解析した結果を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

実施例 1 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体および抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体の製造法

抗 Flt-1 モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ KM1732(FERM BP-5698)、ハイブリドーマ KM1750(FERM BP-5700)、および、抗 KDR モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ KM1992(FERM BP-6217)、ハイブリドーマ KM1995(FERM BP-6218)をそれぞれ  $5 \sim 20 \times 10^6$  細胞/匹をプリスタン処理した 8 週令ヌード雌マウス (Balb/c) の腹腔内に注射した。10 ~ 21 日後に、

ハイブリドーマは腹水精化した。腹水のたまったマウスから、腹水を採取(1～8ml/匹)し、遠心分離(3,000rpm、5分間)して固形分を除去した後カプリル酸沈殿法(アンチボディーズ・ア・ラボラトリー・マニュアル)により精製し、精製モノクローナル抗体とした。

モノクローナル抗体の抗体クラスはサブクラスタイピングキット[ザイメット(Zymed)社製]を用いた酵素免疫測定法を行った。その結果、KM1732はマウス IgG1 サブクラス、KM1750(FERM BP-5700)はマウス IgG2b サブクラス、KM1992(FERM BP-6217)はマウス IgG1 サブクラス、KM1995(FERM BP-6218)はマウス IgG2b サブクラスに属するモノクローナル抗体であった。

実施例2 VEGF 受容体モノクローナル抗体を用いた VEGF 依存性細胞増殖抑制試験

in vitro における血管新生活性の指標である VEGF 依存的なヒト血管内皮細胞の増殖活性に及ぼす 2 つの VEGF 受容体 KDR および Flt-1 モノクローナル抗体の効果を検討した。

ヒト組換え VEGF165 タンパク質は、Cohen らの方法 [Growth Factors, 7, 133 (1992)] に準じてバキュロウイルス-昆虫細胞発現系を用いて発現、精製した。

ヒトさい帯静脈血管内皮細胞(以下、HUVEC と記載;クラボウ社製)は、5% 牛胎児血清(FCS)および EGM-ECGS(Clonetics 社製)を含む EBM 培地(Clonetics 社製)に懸濁し、タイプ I コラーゲンコートプレート上で培養した。以下に示す実験の 24 時間前に 5% FCS を含む M-199 (ニッスイ社製)培地に交換して培養した。

96 ウエルマイクロタイタープレートの各ウエルに 200  $\mu$ l の培地に懸濁した  $1 \times 10^4$  個の HUVEC をまき、37°C、CO<sub>2</sub> インキュベーター中でコンフルエントになるまで培養した。培養後、抗 VEGF 受容体モノクローナル抗体(終濃度 0、1、10  $\mu$ g/ml)を添加し 15 分前培養し、さらに VEGF(終濃度 1 nM)および 1.0  $\mu$  Ci の [<sup>3</sup>H]チミジン(アマシャム社製)を加え 24 時間培養し、培養後に細胞の DNA に取り込まれた [<sup>3</sup>H]チミジンを液体シンチグラフィを用いて測定した。

その結果を第 1 図に示す。HUVEC は VEGF 添加により $[^3\text{H}]$ チミジン取り込みを指標にした細胞増殖が約 2 倍に上昇したが、抗 VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1750 (終濃度  $1 \mu\text{g/ml}$ ) により、増殖は阻害されなかった。一方、抗 VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体 KM1992 (終濃度  $10 \mu\text{g/ml}$ ) により、30.7% の増殖阻害活性が認められた。さらに、抗 VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1750 (終濃度  $1 \mu\text{g/ml}$ ) と抗 VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体 KM1992 (終濃度  $10 \mu\text{g/ml}$ ) の併用により阻害活性は増強し 69.3% の増殖阻害活性が認められた。従って、KDR は血管内皮細胞の増殖に関わる主な受容体であること、Flt-1 は KDR を介した増殖活性を促進する役割があることが示された。

以上から、抗 KDR モノクローナル抗体により、VEGF により誘導される血管内皮細胞の増殖が阻害され、さらに抗 Flt-1 モノクローナル抗体の併用により相乗的な増殖阻害効果が認められた。

#### 実施例3 VEGF 受容体モノクローナル抗体を用いた VEGF 依存性細胞遊走抑制試験

in vitro における血管新生活性の指標である VEGF 依存的なヒト血管内皮細胞の遊走活性に及ぼす 2 つの VEGF 受容体 KDR および Flt-1 モノクローナル抗体の効果を検討した。

細胞遊走試験は Sato らの方法[J. Cell Biology, 107, 1199 (1988)]に従い行った。3.5cm のディッシュでコンフルエントになるまで培養した HUVEC をカミソリ刃で傷をつけた後 PBS で洗浄した。5%FCS を含む M-199 培地を 1.5ml 加え、さらに VEGF (終濃度  $10\text{ng/ml}$ ) および抗 VEGF 受容体モノクローナル抗体 (終濃度 0、1、 $10 \mu\text{g/ml}$ ) を添加し、24 時間培養した。培養後、傷付けた位置より遊走した細胞数を測定した。

その結果を第 2 図に示す。HUVEC は VEGF 添加により細胞遊走能が上昇したが、抗 VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1750 (終濃度  $1 \mu\text{g/ml}$ ) により完全に遊走が阻害された。一方、抗 VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体 KM1992 (終濃度  $10 \mu\text{g/ml}$ ) により、部分的な弱い遊走阻害活性が

認められた。抗 VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1750 (終濃度  $1 \mu\text{g/ml}$ ) と抗 VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体 KM1992 (終濃度  $10 \mu\text{g/ml}$ ) の併用により阻害活性の増強は認められなかった。従って、Flt-1 は血管内皮細胞の遊走に関わる主な受容体であることが示された。

第 3 図は 2 つの抗 VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1750 および KM1732 の血管内皮細胞の遊走阻害活性を比較した結果を示した。モノクローナル抗体濃度  $0.1 \sim 1 \mu\text{g/ml}$  において 2 つのモノクローナル抗体は濃度依存的に血管内皮細胞の遊走阻害活性を示した。

以上から、抗 Flt-1 モノクローナル抗体により、VEGF により誘導される血管内皮細胞の遊走が完全に阻害されることが明らかとなった。

#### 実施例 4 血管新生促進活性因子のノーザンブロット解析

血管新生の過程で血管内皮細胞において活性化され血管新生を促進する活性が報告されている分子 (ets-1, MMP-1, KDR, flt-1) の mRNA 発現に及ぼす 2 つの VEGF 受容体 KDR および Flt-1 モノクローナル抗体の効果を検討した。

6.0cm のディッシュでサブコンフルエントになるまで培養した HUVEC の培地を 5% FCS を含む M-199 培地 (3ml) に交換し、24 時間培養した。培養後抗 VEGF 受容体モノクローナル抗体 (終濃度 0、1、 $10 \mu\text{g/ml}$ ) を添加し 15 分間前培養し、さらに VEGF (終濃度 1 nM) を加え 2 時間および 4 時間培養した。培養後、total RNA を ISOGEN (日本ジーン社製) を用いて添付プロトコールに従い抽出した。ノーザンブロット解析は Iwasaka の方法 [J. Cellular Physiology, 169, 522 (1996)] に従って行った。プローブとして用いる  $^{32}\text{P}$  標識した Human ets-1, MMP-1, GAPDH は Iwasaka の方法 [J. Cellular Physiology, 169, 522 (1996)] に従って調製した。Human KDR および Human flt-1 cDNA は配列番号 1~4 の合成プライマーおよび HUVEC の total RNA を鋳型として用いて Iwasaka の記載した Reverse-transcriptional PCR [J. Cellular Physiology, 169, 522 (1996)] により調製した。なお、配列番号 1 は Human KDR のセンスプライマー、配列番号 2 は Human KDR のアン

チセンスプライマー、配列番号3は Human *flt-1* のセンスプライマー、配列番号4は Human *flt-1* のアンチセンスプライマーをそれぞれ示す。

その結果を第4図に示す。各レーンのトータル RNA 量の標準化マーカーである GAPDH は各レーンで同等のシグナルを示した。HUVEC の VEGF 刺激により、*flt-1*、*ets-1* および MMP-1 mRNA の発現は上昇したが、KDR mRNA の発現は変化しなかった。VEGF 刺激により発現上昇した *flt-1*、*ets-1* および MMP-1 mRNA は、抗 VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1750 (終濃度  $1 \mu\text{g/ml}$ ) により阻害されなかったが、抗 VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体 KM1992 (終濃度  $10 \mu\text{g/ml}$ ) により部分的に阻害された。さらに、抗 VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1750 (終濃度  $1 \mu\text{g/ml}$ ) と抗 VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体 KM1992 (終濃度  $10 \mu\text{g/ml}$ ) の併用により、VEGF 刺激により発現上昇した *flt-1*、*ets-1* および MMP-1 mRNA は、VEGF 未刺激時の発現量にまで完全に阻害された。

従って、KDR は HUVEC の VEGF 刺激において *flt-1*、*ets-1* および MMP-1 mRNA の発現誘導に関わる主な受容体であること、Flt-1 は KDR を介した発現誘導を促進する役割があることが示された。

以上から、抗 KDR モノクローナル抗体により、VEGF 刺激における *flt-1*、*ets-1* および MMP-1 mRNA の発現誘導が阻害され、さらに抗 Flt-1 モノクローナル抗体の併用により相乗的な発現誘導阻害効果が認められた。

#### 実施例5 血管新生促進活性因子のウエスタンブロット解析

血管新生の過程で活性化され血管新生を促進する活性が報告されている分子 (p38、ERK1、ERK2、JNK1 および JNK2) の蛋白質発現に及ぼす2つの VEGF 受容体 KDR および Flt-1 モノクローナル抗体の効果を検討した。6.0cm のディッシュでサブコンフルエントになるまで培養した HUVEC の培地を5% FCS を含む M-199 培地 (3.0ml) に交換し、24 時間培養した。培養後抗 VEGF 受容体モノクローナル抗体 (終濃度 0、1、 $10 \mu\text{g/ml}$ ) を添加し 15 分間前培養し、さらに VEGF (終濃度 1 nM) を加え 5 分間培養した。培養後、細胞に RIPA バッファー (1 mM sodium orthovanadate, 50 mM NaF, 5 mM

b-glycerophosphate, 10 mM sodium pyrophosphate, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mg/ml leupeptin, 1 mg/ml pepstatin)を加え、細胞をディッシュよりはがし、4 °Cで 30 分間細胞を溶解させた。細胞溶解液を 4 °Cにて 15 分間遠心分離(15,000 rpm)し、上清を細胞抽出液として回収した。細胞抽出液は Iwasaka の方法[J. Cellular Physiology, 169, 522 (1996)]に従ってウエスタンブロット解析した。検出抗体としては、1次抗体としてウサギ抗 ACTIVE APK 血清(プロメガ社製)、ウサギ抗 ACTIVE JNK 血清(プロメガ社製)、ウサギ抗 ACTIVE p38 血清(プロメガ社製)を、2次抗体としてはホースラディッシュペルオキシダーゼ標識プロテイン G (パイオラッド社製)を用い、ECL システム(アマシヤム社製)を用いて抗体が反応したバンドを検出した。

その結果を第 5 図に示す。第 5 図に示したように HUVEC の VEGF 刺激により、p38 の発現は上昇が認められた。p38 の発現上昇は抗 VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1750(終濃度 1  $\mu$  g/ml)により VEGF 未刺激時のレベルまで完全に阻害された。一方、抗 VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体 KM1992(終濃度 10  $\mu$  g/ml)により、部分的な弱い阻害活性が認められた。抗 VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1750(終濃度 1  $\mu$  g/ml)と抗 VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体 KM1992(終濃度 10  $\mu$  g/ml)の併用により阻害活性の増強は認められなかった。従って、Flt-1 は p38 発現誘導に関わる主な受容体であることが示された。すなわち、抗 Flt-1 モノクローナル抗体により、VEGF による p38 発現誘導を完全に阻害できることが明らかとなった。

一方、第 5 図のように HUVEC の VEGF 刺激により、ERK1、ERK2、JNK1 および JNK2 の発現は上昇が認められた。ERK1、ERK2、JNK1 および JNK2 の発現上昇は抗 KDR モノクローナル抗体 KM1992(終濃度 10  $\mu$  g/ml)により VEGF 未刺激時のレベルまで完全に阻害された。一方、抗 VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1750(終濃度 1  $\mu$  g/ml)は全く阻害活性を示さなかった。また、抗 VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1750(終濃度 1  $\mu$  g/ml)と抗 VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体 KM1992(終濃度



10  $\mu$ g/ml)の併用により阻害活性の増強は認められなかった。従って、KDR は ERK1、ERK2、JNK1 および JNK2 発現誘導に関わる主な受容体であることが示された。

以上から、抗 KDR モノクローナル抗体により、VEGF による ERK1、ERK2、JNK1 および JNK2 発現誘導を完全に阻害できることが明らかとなった。

#### 実施例6 細胞伸展、アクチンストレスファイバー形成、接着斑形成試験

血管新生の過程で活性化された血管内皮細胞において観察される細胞伸展、アクチンストレスファイバー形成、接着斑形成に及ぼす 2 つの VEGF 受容体 KDR および Flt-1 モノクローナル抗体の効果を検討した。

5%FCS を含む M-199 培地に懸濁した HUVEC ( $3 \times 10^4$ )をタイプ I コラーゲンをコートしたディッシュ (35 mm) にまき 37°C で 2 時間培養した。続いて抗 VEGF 受容体モノクローナル抗体(終濃度 0、1、10  $\mu$ g/ml)を添加し、さらに 15 分間培養した。培養後、VEGF(終濃度 10 ng/ml)を加え 15 分間培養した。培養後、細胞を 3.7 %ホルムアルデヒドで固定し、さらに、0.1 % NP40 を含む PBS を加え、細胞の膜透過性を上昇させた。続いて 1 %BSA を含む PBS で非特異的結合部位をブロック後、F-actin は Nehls らの方法 [Microvascular Research, 42, 103 (1991)] に従い rhodamine-conjugated phalloidin を用いて検出した。Vinculin は Kellie らの方法 [Experimental Cell Research, 160, 259 (1985)]に従い抗 vinculin モノクローナル抗体(生化学工業社製)および FITC 標識抗マウス抗体(Jackson ImmunoResearch Laboratories 社製)を用いる間接蛍光抗体法により検出した。F-actin および Vinculin の検出には Confocal microscopy, LSM410 (カールツァイス社製)を用いた。細胞の大きさは NIH image program を用いて解析した。

その結果を表1および第6図に示す。

表 1

添加サンプル	VEGF	-	+	+	+
	抗Flt-1モノクローナル抗体	-	-	+	-
	抗KDRモノクローナル抗体	-	-	-	+
細胞形態変化	アクチンストレスファイバー形成	-	+	-	+
	接着斑形成	-	+	+	-

表 1 に示すように、VEGF 刺激により HUVEC のアクチンストレスファイバー形成、接着斑形成が促進されたが、アクチンストレスファイバー形成は抗 VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1750 (終濃度 1  $\mu$ g/ml) により選択的に阻害され、一方、接着斑形成は抗 KDR モノクローナル抗体 KM1992 (終濃度 10  $\mu$ g/ml) により選択的に阻害された。

第 6 図に示すように、VEGF 刺激により HUVEC は大型化するが、抗 VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体 KM1750 (終濃度 1  $\mu$ g/ml) により選択的に阻害されたが、抗 KDR モノクローナル抗体 KM1992 (終濃度 10  $\mu$ g/ml) により阻害されなかった。従って、KDR は接着斑形成に関わる主な受容体であり、一方、Flt-1 はアクチンストレスファイバー形成、細胞大型化に関わる主な受容体であることが示された。

以上から、抗 KDR モノクローナル抗体により、VEGF による接着斑形成が阻害できること、一方、抗 VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体により、VEGF によるアクチンストレスファイバー形成、細胞大型化が阻害できることが明らかとなった。

#### 参考例 1 抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体の製造方法

##### 1. 抗原の調製

##### (1) 可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 3N 発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 Flt-1 の N 末端アミノ酸から 1～338 番目 (シグナル配列を含

む)に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 断片(以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 3N と称す)を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 3N は、可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 の細胞外領域の N 末端側から 3 個のイムノグロブリン様部位に相当する。

ヒト VEGF 受容体 Flt-1 の完全長 cDNA をコードする cDNA クローン flt#3-7 [Oncogene, 5, 519, (1990)] を EcoRI と TaqI の両制限酵素により部分切断し、5' 末端から 1263bp の EcoRI-TaqI DNA 断片を回収し、バキュロウイルス遺伝子組み換えベクター pVL1393 プラスミド(インビトロジェン社製)のポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流 5' 側 EcoRI および 3' 側 NotI 部位に、人為的に終始コドンを導入した TaqI-NotI アダプター(配列番号 5 および配列番号 6 に示した塩基配列を有する合成 DNA)を用いて組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 3N 発現ベクター pVL1393/Flt 3N を作製した(第 7 図)。

## (2) 可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N 発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 Flt-1 の N 末端アミノ酸から 1~750 番目(シグナル配列を含む)に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 断片(以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N と称す)を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N は、可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 の細胞外領域の 7 個のイムノグロブリン様部位に相当する。

配列番号 7 および配列番号 8 に示した塩基配列を有するプライマー 10 pmol、flt#3-7 クローン [Oncogene, 5, 519, (1990)] DNA 10 ng、および、10 mM デオキシヌクレオチド三リン酸 (deoxynucleotide triphosphates) を含む 10 mM MgCl<sub>2</sub>、0.001% (W/V) ゼラチン溶液 100  $\mu$ l に 2.5 units Taq ポリメラーゼを加えた。反応は 95℃ で 5 分間の前処理した後に、95℃ で 90 秒間、50℃ で 90 秒間、最後に 72℃ で 90 秒間のポリメラーゼ・チェイン・リアクション (PCR) を 30 回繰り返して、DNA 断片を回収した。この DNA 断片を HindIII (flt#3-7 クローンで 1893bp の位置) と NotI により切断し、610 bp の HindIII-NotI DNA 断片、すなわち flt#3-7 クローンで 1894-2499bp 断片と終始コドンおよび NotI 認識配列を含む DNA 断片を回収した。次に、flt#3-7 クローンを EcoRI と HindIII の両制限酵素により切断し、5' 末端から 1893 bp の EcoRI-HindIII 断片を回収した。続い

て、610 bp の HindIII-NotI DNA 断片、および、1893 bp の EcoRI-HindIII 断片をバキュロウイルス遺伝子組み換えベクター pVL1393 プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流 5' 側 EcoRI および 3' 側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N 発現ベクター pVL1393/Flt 7N を作製した(第8図)。

### (3) 昆虫細胞による可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 発現を行うための組み換えウイルスの作製

昆虫細胞による蛋白質の生産には目的遺伝子を組み込んだ組み換えウイルスの作製が必要であるが、その作製にはトランスファーベクターと呼ばれる目的蛋白質をコードする cDNA を特殊なプラスミドに組み込む過程と野生型ウイルスとトランスファーベクターを昆虫細胞にコトランスフェクションし、相同組み換えにより組み換えウイルスを取得する過程を経る。以上の過程についてファーマンジェン社製バキュロゴールドスターターキット(製品番号 PM-21001K)を用いてそのマニュアルに従い以下の手順で行った。

TMN-FH インセクトメディウム(ファーマンジェン社製)にて培養した昆虫細胞 Sf9 (ファーマンジェン社製)に線状バキュロウイルス DNA [バキュロゴールド・バキュロウイルス DNA(BaculoGold baculovirus DNA)、ファーマンジェン社製]および作製したトランスファーベクター DNA をリポフェクチン法にて導入すること [蛋白質核酸酵素、37, 2701(1992)]により行い組み換えバキュロウイルスを以下のように作製した。

(2)で作製した pVL1393/Flt7N あるいは(1)で作製した pVL1393/Flt3N の 1  $\mu$ g と線状バキュロウイルス DNA の 20ng とを 12  $\mu$ l の蒸留水に溶解し、さらにリポフェクチン 6  $\mu$ l と蒸留水 6  $\mu$ l とを混和したものを加え室温で 15 分間放置した。一方 Sf9 細胞  $1 \times 10^6$  個を 2ml の Sf900-II 培地[ギブコ(Gibco) 社製]に懸濁し、直径 35mm の細胞培養用プラスチックシャーレに入れた。ここに上記のプラスミド DNA、線状バキュロウイルス DNA およびリポフェクチン混和溶液全量を加え 27℃で 3 日間培養後、組み換えウイルスを含む培養上清 1ml を採取した。シャーレには新たに Sf900-II 培地 1ml を加え、さらに 27℃で 3 日間培養し組み換えウイルスを含む培養上清をさらに 1.5ml 得た。

次に蛋白質発現に用いるために得られた組み換えウィルスを以下の手順で増殖させた。

Sf9 細胞  $2 \times 10^7$  個を 10ml の Sf900-II 培地に懸濁し、 $175\text{cm}^2$  フラスコ (グライナー社製) に入れて室温で 1 時間放置して細胞をフラスコに付着させた。放置後上清を除き新たに 15ml の TMN-FH インセクトメディウムと上記の組み換えウィルスを含む培養上清のうち 1ml を加え  $27^\circ\text{C}$  で 3 日間培養した。培養後上清を  $1,500 \times g$  で 10 分間遠心分離して細胞を除き、蛋白質発現に使用する組み換えウィルス溶液を得た。

得られた組み換えウィルス溶液についてウィルスの力価をバキュロゴールドスターキット・マニュアル (ファーマンジェン社製) に記載の方法で算定した。

Sf9 細胞  $6 \times 10^6$  個を 4ml の Sf900-II 培地に懸濁し、直径 60mm の細胞培養用プラスチックシャーレに入れ、室温で 1 時間放置して細胞をシャーレに付着させた。次に上清を除き新たに Sf900-II 培地  $400 \mu\text{l}$  と Sf900-II 培地で 10,000 倍に希釈した上記組み換えウィルス溶液を加え室温で 1 時間放置した後、培地を除き 5ml の 1% 低融点アガロース [アガーブラーク・アガロース (Agarplaque Agarose)、ファーマンジェン社製] を含む培地 [滅菌した 1ml の 5% アガーブラーク・アガロース水溶液と 4ml の TMN-FH インセクトメディウムを混和し、 $42^\circ\text{C}$  に保温したもの] を該シャーレに流し込んだ。室温で 15 分間放置した後、乾燥を防ぐためビニルテープをシャーレにまき、密閉可能なプラスチック製容器に該シャーレを入れ、 $27^\circ\text{C}$  で 6 日間培養した。該シャーレに 0.01% ニュートラルレッドを含む PBS 1ml を加えさらに 1 日培養した後、出現したブラークの数を数えた。以上の操作より該組み換えウィルス溶液はいずれも約  $1 \times 10^7$  PFU/ml のウィルスを含んでいることがわかった。

(4) 昆虫細胞における可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N の発現、精製

可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N は以下のようにして得た。High Five 細胞  $4 \times 10^7$  個を  $175\text{cm}^2$  フラスコ (グライナー社製) に EX-CELL™ 400 培地 (JRH Bioscience 社製) 30ml に懸濁し、室温で 1 時間放置し、フラスコに付着させた。(3) で得られたトランスファーベクター pVL1393/Flt 7N

および pVL1393/Flt 3N 由来の組み換えウィルスを約  $1 \sim 3 \times 10^8$  PFU /ml の濃度で含む溶液を 1ml 加え、室温で 2 時間感染させた。培養上清を除き新たに 30ml の EX-CELL™400 培地 30ml を加え 27℃ にて 3~4 日間培養した。培養終了後、培養上清を回収し  $1,500 \times g$  で 10 分間遠心分離を行い上清を得た。

カラムに約 60ml のヘパリンーセファロース CL-6B ゲル[ファルマシア・バイオテック(Pharmacia Biotech) AB 社製]を充填し、600ml の 20mM トリスー塩酸 (pH7.5) 緩衝液を用いて 0.5ml/分の流速でカラムを洗浄した。洗浄後、上記のように調整した可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N を含む培養液 1000ml を 0.5ml/分の流速でヘパリンーセファロース CL-6B カラムに通塔した。さらに 600ml の 20mM トリスー塩酸 (pH7.5) を用いて 0.5ml/分の流速で洗浄した後、濃度勾配が 0 M~1.1M の NaCl 含有 20mM トリスー塩酸 (pH7.5) からなる緩衝液を 600 ml 通塔し、ヘパリンーセファロースに吸着した蛋白質の溶出を行うと共に 8ml ずつ溶出液を分画した。各分画に含まれる蛋白質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) にて解析し、可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N を含む分画を 60~80ml 回収し、セントリプレップ 10 (アミコン社製) を用いて濃縮した。濃縮後、可溶性のヒト Flt-1 7N および Flt-1 3N を溶液としてそれぞれ 5ml および 13ml (蛋白質濃度は  $331 \mu g/ml$  および  $204 \mu g/ml$ ) 得た。

(5) 可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N の純度の確認

精製可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-17N および Flt-1 3N の純度を SDS-PAGE を用いて確認した。SDS-PAGE は文献記載の方法 [Anticancer Research, 12, 1121 (1992)] に従った。ゲルには 5~20% グラジエントゲル (アトー社製) を用い、還元条件下でレーンあたりの蛋白質量として  $2 \mu g$  の Flt-1 7N および Flt-1 3N をそれぞれ泳動し、クーマシーブリリアントブルーにて染色した。第9図に結果を示した。Flt-17N および Flt-1 3N の純度は 95% 以上であった。

(6) 可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N の対照抗原蛋白質の精製

可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N の対照抗原蛋白質 (ネガティブコントロール蛋白質) は以下のようにして得た。High Five 細胞  $4 \times 10^7$  個を

175cm<sup>2</sup> フラスコ (グライナー社製) に EX-CELL<sup>TM</sup>400 培地 (JRH Bioscience 社製) 30ml に懸濁し、室温で 1 時間放置し、フラスコに付着させ、27℃ にて 3~4 日間培養した。培養終了後、培養上清を回収し 1,500×g で 10 分間遠心分離を行い上清を得た。

カラムにヘパリンセファロース CL-6B ゲル [ファルマシア・バイオテック (Pharmacia Biotech) AB 社製] 約 20ml を充填し、200ml の 20mM トリス-塩酸 (pH7.5) 緩衝液を用いて 0.5ml/分の流速で洗浄した。洗浄後、上記のように調製した High Five 細胞の培養液 500ml を 0.5ml/分の流速でヘパリンセファロース CL-6B カラムに通塔した。さらに 200ml の 0.2M NaCl を含む 20mM トリス-塩酸 (pH7.5) を用いて 0.5ml/分の流速で洗浄した後、1M NaCl を含む 20mM トリス-塩酸 (pH7.5) からなる緩衝液を 200 ml 通塔し、ヘパリンセファロースに吸着した蛋白質を溶出した。1M NaCl 溶出画分をセントリプレップ 10 (アミコン社製) を用いて濃縮し対照抗原蛋白質を溶液として 7 ml (蛋白質濃度として 867  $\mu$ g/ml) 得た。

(7) 可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N のヒト VEGF 結合活性の確認

可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N のヒト VEGF 結合活性を以下の手順により確認した。

96 ウェル・イムオビロン<sup>TM</sup>-P フィルトレーション・プレート (96-well Immobilon<sup>TM</sup>-P Filtration Plate ; ミリポア社製) にメタノールを 100  $\mu$  l/ウェルで分注し、プレート底部の PVDF 膜を親水化した。水で洗浄後、PBS 希釈 2  $\mu$ g/ml 可溶性ヒト Flt-1 7N を 50  $\mu$  l/ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1 % 牛血清アルブミン (BSA) を含む PBS を 100  $\mu$  l/ ウェル加え、室温 1 時間反応させて残っている活性基をブロックした。PBS で洗浄後、(4) で取得した精製可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N を 50  $\mu$  l/ウェルで分注し (最終濃度 1~1000 ng/ml)、さらに、<sup>125</sup>I 標識ヒト VEGF (最終濃度 3ng/ml: アマシャム社製) を 50  $\mu$  l/ ウェル加え、室温で 1.5 時間反応させた。0.05% tween-PBS で洗浄後、50℃にてウェルを乾燥させ、マイクロシンチ-O (パッカード社製) を 20  $\mu$  l/ウェル加え、トップカウント (パッカード社製) を用い

て、各ウエルに結合した  $^{125}\text{I}$  標識ヒト VEGF の放射活性を測定した。

結果を第10図に示す。可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N は濃度依存的に  $^{125}\text{I}$  標識ヒト VEGF の可溶性ヒト Flt-1 7N への結合を阻害することが示された。可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N は同程度のヒト VEGF 結合活性を示したことから、ヒト VEGF は Flt-1 3N 部分(シグナル配列を含むN末端アミノ酸から1から338番目)に結合することが明らかとなった。

#### (8) 昆虫細胞におけるヒト VEGF の発現

ヒト VEGF は以下のようにして得た。High Five 細胞  $4 \times 10^7$  個を  $175\text{cm}^2$  フラスコ(グライナー社製)に EX-CELL<sup>TM</sup>400 培地(JRH Bioscience 社製)30ml に懸濁し、室温で1時間放置し、フラスコに付着させた。文献[Cell Growth & Differentiation, 7, 213 (1996)]記載の方法により得られたヒト VEGF 組み換えバキュロウィルス溶液を約  $1 \sim 3 \times 10^8$  PFU/ml の濃度で含む溶液を1ml 加え、室温で2時間感染させた。培養上清を除き新たに30mlの EX-CELL<sup>TM</sup>400 培地30mlを加え  $27^\circ\text{C}$  にて3~4日間培養した。培養終了後、培養上清を回収し  $1,500 \times g$  で10分間遠心分離を行い上清を得た。

カラムに約40mlのヘパリンセファロース CL-6B ゲル[ファルマシア・バイオテック(Pharmacia Biotech) AB 社製]を充填し、400mlの20mMトリス塩酸(pH7.5) からの緩衝液を用いて0.5ml/分の流速で洗浄した。洗浄後、上記のように調製したヒト VEGF を含む培養液1500mlを0.5ml/分の流速でヘパリンセファロース CL-6B カラムに通塔した。さらに400mlの20mMトリス塩酸(pH7.5)を用いて0.5ml/分の流速で洗浄した後、0.2M、0.5M および1MのNaCl含有20mMトリス塩酸(pH7.5)からの緩衝液各120mlを順次通塔し、ヘパリンセファロースに吸着した蛋白質を段階的に溶出を行うと共に8mlずつ溶出液を分画した。各分画に含まれる蛋白質をSDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて解析し、ヒト VEGF を含む分画(0.5~1 MNaCl 画分)を120ml回収した。セントリプレップ-10(アモコン社製)で濃縮後、ヒト VEGF を溶液として4ml(蛋白質濃度1.2 mg/ml)得た。

#### 2. 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

1(4)より得られた各種抗原  $50 \mu\text{g}$  をそれぞれアルミニウムゲル2mg および百



日咳ワクチン(千葉県血清研究所製)  $1 \times 10^8$  細胞とともに 5 週令雌 BALB/c (日本 SLC 社製)、B6C3F1 マウス(日本チャールズリバー社製)あるいは雌 SD ラット(日本 SLC 社製)に投与し、2 週間後より  $10 \sim 50 \mu\text{g}$  の蛋白質を 1 週間に 1 回、計 4 回投与した。また、NIH3T3-Flt-1 細胞  $1 \times 10^7$  個を 5 週令雌 BALB/c (日本 SLC 社製)3匹に投与し、計6回投与した。眼底静脈叢あるいは尾静脈より採血し、その血清抗体価を以下に示す酵素免疫測定法で調べ、十分な抗体価を示したマウスあるいはラットから最終免疫 3 日後に脾臓を摘出した。なお、NIH3T3-Flt-1 細胞を投与した 5 週令雌 BALB/c では免疫がかからず、可溶性 Flt-1 7N に対する抗体価は上昇しなかった。

脾臓を MEM 培地(日水製薬社製)中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離(1,200rpm、5 分間)した後、上清を捨て、トリス-塩化アンモニウム緩衝液(pH7.65)で 1 ～2 分間処理し赤血球を除去し、MEM 培地で 3 回洗浄し、細胞融合に用いた。

### 3. 酵素免疫測定法

1(4)で得られた可溶性ヒト Flt-1 7N および Flt-1 3N を免疫したマウスあるいはラットに由来する抗血清およびハイブリドーマの培養上清の測定に関しては、抗原として、1(4)の昆虫細胞培養上清より得られた可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N および Flt-1 3N を用いた。96 ウェルの EIA 用プレート(グライナー社製)に、PBS 希釈  $1 \sim 10 \mu\text{g/ml}$  可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N、Flt-1 3N および対照抗原として 1(6)で得られた High Five 細胞培養上清のヘパリンカラム吸着面分を、それぞれ  $50 \mu\text{l}$ /ウェルで分注し、 $4^\circ\text{C}$ で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1 %牛血清アルブミン(BSA)を含む PBS を  $100 \mu\text{l}$ /ウェル加え、室温 1 時間反応させて残っている活性基をブロックした。1%BSA-PBS を捨て、被免疫マウスあるいは被免疫ラット抗血清およびハイブリドーマの培養上清を  $50 \mu\text{l}$ /ウェルで分注し 2 時間反応させた。0.05% tween-PBS で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスイムノグロブリンあるいはペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン(ともに DAKO 社製)を  $50 \mu\text{l}$ /ウェルに加えて室温、1 時間反応させ、0.05% tween-PBS で洗浄後 ABTS 基質液[2,2'-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸)アンモニウム]を用いて発色させ OD415nm の

吸光度 E max [モレキュラー・デバイシズ (Molecular Devices) 社製] を測定した。

#### 4. マウス骨髄腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髄腫細胞株 P3-U1 を正常培地で培養し、細胞融合時に  $2 \times 10^7$  以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

#### 5. ハイブリドーマの作製

2 で得られたマウス脾細胞またはラット脾細胞と 4 で得られた骨髄腫細胞とを 10:1 になるよう混合し、遠心分離 (1,200rpm、5 分間) した後、上清を捨て、沈澱した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37℃で、ポリエチレングライコール 1000 (PEG-1000) 2g、MEM 培地 2ml および DMSO 0.7ml の混液 0.2～1ml/ $10^8$  マウス脾細胞を加え、1～2 分間毎に MEM 培地 1～2ml を数回加えた後、MEM 培地を加えて全量が 50ml になるようにした。遠心分離 (900rpm、5 分間) 後、上清を捨て、ゆるやかに細胞をほぐした後、メスピペットによる吸込み、吸出しでゆるやかに細胞を HAT 培地 100ml 中に懸濁した。

この懸濁液を 96 ウェル培養用プレートに 100  $\mu$  l/ウェルずつ分注し、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター中、37℃で 10～14 日間培養した。この培養上清を上述した酵素免疫測定法で調べ、1 (4) で得られた可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N あるいは Flt-1 3N に特異的に反応し、かつ 1 (6) で得られた対照抗原に反応しないウェルを選び、さらに HT 培地と正常培地に換え、2 回クローニングを繰り返して、抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株を確立した。以下、表 2 にその結果を示す。

表 2

動物	匹数	免疫原	スクリーニング原	スクリーニングしたウェル数	確立したハイブリドーマ数
Balb/cマウス	3	NIH3T3-Flt-1	Flt 7N	-	-
SDラット	1	Flt 7N	Flt 7N	1008	3 (KM1733, 1735, 1736)
Balb/cマウス	1	Flt 7N	Flt 7N	872	5 (KM1737, 1739, 1740, 1742, 1743)
SDラット	1	Flt 7N	Flt 7N	1176	3 (KM1745, 1746, 1747)
B3C3F1マウス	1	Flt 7N	Flt 3N	672	3 (KM1748, 1749, 1750)
Balb/cマウス	1	Flt 7N	Flt 3N	420	3 (KM1730, 1731, 1732)

1(4)で得られた可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N を免疫した Balb/c マウス 1 匹、あるいは SD ラット 2 匹から得られたハイブリドーマを可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N を用いてそれぞれ約 672 ウェルおよび約 2184 ウェルずつスクリーニングした結果、それぞれ 5 クローンおよび 6 クローンの抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体を得、これらをそれぞれ KM1737、KM1739、KM1740、KM1742、KM1743 および KM1733、KM1735、KM1736、KM1745、KM1746、KM1747 と命名した。これらのクローンの中で、ヒト VEGF の Flt-1 結合阻害作用を示すものはなかった。さらに、KM1735、KM1736、KM1742、KM1743 および KM1745 は免疫細胞染色法においてヒト VEGF 受容体 Flt-1 発現細胞と反応したが、KM1730、KM1731 および KM1732 に比較して極めて弱いものであった。

一方、1(4)で得られた可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 7N を免疫した B3C3F1 マウス 1 匹、および、Balb/c マウス 1 匹から得られたハイブリドーマを 1(4)で得られた可溶性ヒト VEGF 受容体 Flt-1 3N を用いてそれぞれ約 672 ウェルおよび 420 ウェルスクリーニングした結果、それぞれから 3 クローンずつ抗ヒト VEGF 受容体 Flt-1 モノクローナル抗体を得、これらをそれぞれ KM1748、KM1749、KM1750 および KM1730、KM1731、KM1732 と命名した。これらクローンの中で後記 8 で示したヒト VEGF の Flt-1 結合阻害作用を示すものとして KM1732、KM1748 および KM1750 の 3 クローンが認められた。さらに、KM1730、KM1731 および KM1732 の 3 クローンは免疫細胞染色法においてヒト VEGF 受容体 Flt-1 発現細胞に極めて強く反応した。

モノクローナル抗体の抗体クラスはサブクラスタイピングキット[ザイメット(Zymed)社製]を用いた酵素免疫測定法を行った。その結果を以下の表3に示す。

表 3

モノクローナル抗体	抗体サブクラス
KM1733	マウス IgG2a
KM1735	ラット IgG1
KM1736	ラット IgG2a
KM1737	マウス IgG1
KM1739	マウス IgG1
KM1740	マウス IgG1
KM1742	マウス IgG1
KM1743	マウス IgG1
KM1745	ラット IgG2a
KM1746	ラット IgG1
KM1747	ラット IgG1
KM1748	マウス IgG2b
KM1749	マウス IgG1
KM1750	マウス IgG2b
KM1730	マウス IgG1
KM1731	マウス IgG2a
KM1732	マウス IgG1

本発明で確立したモノクローナル抗体はすべて IgG クラスであった。

## 参考例2 抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体の製造方法

### 1. 抗原の調製

抗原として可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体および可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 各種誘導体を以下のようにして調製した。

(1)可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する配列番号 35 記載の 19 アミノ酸及び成熟体ヒト VEGF 受容体 KDR である、配列番号 34 記載のアミノ酸配列 1～738 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片、6 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #1) 及びヒト抗体 Fc 領域を構成する 227 アミノ酸から成る融合タンパク質 (以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N-Fc と称す) を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N-Fc は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 7 個のイムノグロブリン様部位及び 6 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #1) 及びヒ

ト抗体 Fc 領域から成る融合タンパク質に相当する。

ヒト VEGF 受容体 KDR の完全長 cDNA をコードする cDNA クローン BCMGS-neo-KDR[Cell Growth & Differentiation 7, 213-221 (1996)]を EcoRI で切断し、KDR の細胞外領域及び膜結合領域をコードする約 2.8 kb の断片を pUC18 の EcoRI 部位に組み込むことによって、pUC-KDR を作製した。pUC-KDR を XhoI で切断し、Klenow 処理後、XbaI リンカー (配列番号 9) を挿入することによって pUC-KDR-Xb を作製した。pUC-KDR-Xb の XbaI-BamHI (2.3 kbp) 断片を pBluescriptII KS(+)の XbaI/BamHI 部位に挿入した後、SphI-BamHI (5.2 kbp)断片を調製し、SnaBI 部位を含む合成リンカー (配列番号 10 及び配列番号 11)を挿入し、pBS-KDR-Xb-S を作製した。pBS-KDR-Xb-S の XbaI/SnaBI (2.3 kbp)断片、プラスミド pAMoPRFc [The Journal of Immunology 158, 707-714(1997)]上のヒト抗体の Fc 領域をコードする SnaBI/NotI (0.7 kbp)断片をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクター pVL-KDR-7N-Fc を構築した (第 11 図)。

(2)可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-6N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する配列番号 35 記載の 19 アミノ酸及び成熟体ヒト VEGF 受容体 KDR である、配列番号 34 記載のアミノ酸配列 1~638 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片、6 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #1) 及びヒト抗体 Fc 領域を構成する 227 アミノ酸から成る融合タンパク質 (以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-6N-Fc と称す) を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-6N-Fc は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 6 個のイムノグロブリン様部位及び 6 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #1) 及びヒト抗体 Fc 領域から成る融合タンパク質に相当する。

配列番号 12 及び配列番号 13 に示した塩基配列を有するプライマー 10 pmol、

pBS-KDR-Xb-S(抗原の調製(1)参照) DNA 10ng、及び、10mM デオキシヌクレオチド三リン酸(deoxynucleotide triphosphates)を含む 10mM  $MgCl_2$ 、0.001% (W/V)ゼラチン溶液 100  $\mu$ l に 2.5 units Taq ポリメラーゼを加えた。反応は 95℃で 5 分間の前処理した後に、95℃で 90 秒間、50℃で 90 秒間、最後に 72℃で 90 秒間のポリメラーゼ・チェーン・リアクション(PCR)を 30 回繰り返し、DNA 断片を回収した。本 DNA 断片を EcoT22I と SnaBI で切断し、80 bp の EcoT22I/SnaBI 断片を得た。本 DNA 断片及び pBS-KDR-Xb-S(抗原の調製(1)参照)の EcoT22I/SnaBI(5.2 kbp)断片を連結させ pBS-KDR(6N)L を作製した。pBS-KDR(6N)L の XbaI/SnaBI(2.0 kbp)及び pAMoPRFc(抗原の調製(1)参照)上のヒト抗体の Fc 領域をコードする SnaBI/NotI(0.7 kbp)をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン(Polyhedrin)遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-6N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクター pVL-KDR-6N-Fc を構築した。

### (3)可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する配列番号 35 記載の 19 アミノ酸及び成熟体ヒト VEGF 受容体 KDR である、配列番号 34 記載のアミノ酸配列 1~518 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片、6 アミノ酸残基からなるリンカー(リンカー #1)及びヒト抗体 Fc 領域を構成する 227 アミノ酸から成る融合タンパク質(以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5N-Fc と称す)を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5N-Fc は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 5 個のイムノグロブリン様部位及び 6 アミノ酸残基からなるリンカー(リンカー #1)及びヒト抗体 Fc 領域から成る融合タンパク質に相当する。

pUC-KDR-Xb の EcoRI/HincII(1.9 kbp)断片及び配列番号 14 及び配列番号 15 の塩基配列を有する合成リンカーをベクター pBluescriptII SK(-)の EcoRI/NotI 部位に挿入し、pBS-KDR-5N を構築した。pBS-KDR-5N の

XbaI/SnaBI (1.9 kbp) 断片及び pAMoPRFc (抗原の調製(1)参照) 上のヒト抗体の Fc 領域をコードする SnaBI/NotI (0.7 kbp) をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流 5' 側 XbaI 及び 3' 側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクター pVL-KDR-5N-Fc を構築した。

(4) 可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する配列番号 35 記載の 19 アミノ酸及び成熟体ヒト VEGF 受容体 KDR である、配列番号 34 記載のアミノ酸配列 1~393 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片、2 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #2) 及びヒト抗体 Fc 領域を構成する 227 アミノ酸から成る融合タンパク質 (以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4N-Fc と称す) を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4N-Fc は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 4 個のイムノグロブリン様部位及び 2 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #2) 及びヒト抗体 Fc 領域から成る融合タンパク質に相当する。

配列番号 16 および配列番号 17 に示した塩基配列を有するプライマー 10 pmol、pUC-KDR-Xb DNA 10 ng、及び、10 mM デオキシヌクレオチド三リン酸 (deoxynucleotide triphosphates) を含む 10 mM MgCl<sub>2</sub>、0.001% (W/V) ゼラチン溶液 100  $\mu$  l に 2.5 units Taq ポリメラーゼを加えた。反応は 95℃ で 5 分間の前処理した後に、95℃ で 90 秒間、50℃ で 90 秒間、最後に 72℃ で 90 秒間のポリメラーゼ・チェイン・リアクション (PCR) を 30 回繰り返して、DNA 断片を回収した。この DNA 断片を HindIII と KpnI により切断し、520 bp の HindIII-KpnI DNA 断片を得た。本 DNA 断片と、pAMoPRFc 上のヒト抗体の Fc 領域をコードする KpnI/NotI (0.7 kbp) 断片とをベクター pAMoPRFc (抗原の調製(1)参照) の HindIII/NotI 部位に挿入し、pAMo-4N-Fc を構築した。pAMo-4N-Fc の HindIII/NotI (1 kbp) 及び pUC-KDR-Xb の XbaI/HindIII (0.7 kbp) をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写

開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクター pVL-KDR-4N-Fc を構築した。

(5)可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-3N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する配列番号 35 記載の 19 アミノ酸及び成熟体ヒト VEGF 受容体 KDR である、配列番号 34 記載のアミノ酸配列 1~294 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片、6 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #1) 及びヒト抗体 Fc 領域を構成する 227 アミノ酸から成る融合タンパク質 (以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-3N-Fc と称す) を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-3N-Fc は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 3 個のイムノグロブリン様部位及び 6 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #1) 及びヒト抗体 Fc 領域から成る融合タンパク質に相当する。

pUC-KDR-Xb (抗原の調製(1)参照) の EcoRI/EcoT14I (1.2kbp) 断片及び配列番号 18 及び配列番号 19 の塩基配列を有する合成リンカーを pBluescriptII SK(-) の EcoRI/NotI 部位に挿入し、pBS-KDR-3N を構築した。pBS-KDR-3N の XbaI/SnaBI (1.2kbp) 断片及び pAMoPRFc (抗原の調製(1)参照) 上のヒト抗体の Fc 領域をコードする SnaBI/NotI (0.7kbp) 断片をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-3N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクター pVL-KDR-3N-Fc を構築した。

(6)可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-2N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する配列番号 35 記載の 19 アミノ酸及び成熟体ヒト VEGF 受容体 KDR である、配列番号 34 記載のアミノ酸配列 1~194 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片、6 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #1) 及びヒト抗体 Fc 領域を構成する 227 アミノ酸か



ら成る融合タンパク質(以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-2N-Fc と称す)を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-2N-Fc は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 2 個のイムノグロブリン様部位及び 6 アミノ酸残基からなるリンカー(リンカー #1)及びヒト抗体 Fc 領域から成る融合タンパク質に相当する。

pUC-KDR-Xb (抗原の調製(1)参照)の EcoRI/VspI (0.9kbp)断片及び配列番号 20 及び配列番号 21 の塩基配列を有する合成リンカーを pBluescriptII SK(-)の EcoRI/NotI 部位に挿入し、pBS-KDR-2N を構築した。pBS-KDR-2N の XbaI/SnaBI (0.9kbp)断片及び pAMoPRFc (抗原の調製(1)参照)上のヒト抗体の Fc 領域をコードする SnaBI/NotI (0.7 kbp)をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-2N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクター pVL-KDR-2N-Fc を構築した。

(7)可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-1N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する配列番号 35 記載の 19 アミノ酸及び成熟体ヒト VEGF 受容体 KDR である、配列番号 34 記載のアミノ酸配列 1~104 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片、6 アミノ酸残基からなるリンカー(リンカー #1)及びヒト抗体 Fc 領域を構成する 227 アミノ酸から成る融合タンパク質(以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-1N-Fc と称す)を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-1N-Fc は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 1 個のイムノグロブリン様部位及び 6 アミノ酸残基からなるリンカー(リンカー #1)及びヒト抗体 Fc 領域から成る融合タンパク質に相当する。

pBS-KDR-2N (抗原の調製(6)参照)の BglII/NotI (2.8 kbp)断片に、配列番号 22 及び配列番号 23 の塩基配列を有する合成リンカーを連結し、pBS-KDR-1N を構築した。pBS-KDR-1N の XbaI/SnaBI (0.4kbp)断片及び pAMoAPRFc (抗原の調製(1)参照)上のヒト抗体の Fc 領域をコードする SnaBI/NotI (0.7kbp)

をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-1N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクター pVL-KDR-1N-Fc を構築した。

(8) 可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7D1N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクターの構築

可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N-Fc (抗原の調製(1)参照) から、N 末端側から 1 番目のイムノグロブリン様部位を形成する 31 番目のアミノ酸から 102 番目のアミノ酸までの計 72 個のアミノ酸を欠失させた KDR 断片、6 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #1) 及びヒト抗体 Fc 領域を構成する 227 アミノ酸から成る融合タンパク質 (以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7  $\Delta$ 1N-Fc と称す) を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7D1N-Fc は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 2~7 番目のイムノグロブリン様部位及び 6 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #1) 及びヒト抗体 Fc 領域から成る融合タンパク質に相当する。

配列番号 24 及び配列番号 25 に示した塩基配列を有するプライマー 10pmol、pVL-KDR-7N (抗原の調製(14)参照) DNA 10ng、及び、10mM デオキシヌクレオチド三リン酸 (deoxynucleotide triphosphates) を含む 10mM MgCl<sub>2</sub>、0.001% (W/V) ゼラチン溶液 100  $\mu$ l に 2.5units Taq ポリメラーゼを加えた。反応は 95℃で 5 分間の前処理した後に、95℃で 90 秒間、50℃で 90 秒間、最後に 72℃で 90 秒間のポリメラーゼ・チェイン・リアクション (PCR) を 30 回繰り返し、DNA 断片を回収した。本 DNA 断片を XbaI と BglII で切断し、0.8 kbp の XbaI/BglII 断片を得た。本 DNA 断片及び pVL-KDR-5N (抗原の調製(17)参照) の BglII/NotI (1.6 kbp) 断片を pBluescriptII SK(-) の XbaI/NotI に挿入し、pBS-KDR-5  $\Delta$ 1N を作製した。pBS-KDR-5  $\Delta$ 1N の XbaI/HincII (1.6kbp) 断片及び pVL-KDR-7N-Fc (抗原の調製(1)参照) の HincII/NotI (1.2 kbp) をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト

VEGF 受容体 KDR-7D1N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクター pVL-KDR-7  $\Delta$ 1N-Fc を構築した。

(9) 可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5  $\Delta$ 1N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクターの構築

可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5N-Fc (抗原の調製(3)参照) から、N 末端側から 1 番目のイムノグロブリン様部位を形成する 31 番目のアミノ酸から 102 番目のアミノ酸までの計 72 個のアミノ酸を欠失させた KDR 断片、6 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #1) 及びヒト抗体 Fc 領域を構成する 227 アミノ酸から成る融合タンパク質 (以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5  $\Delta$ 1N-Fc と称す) を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5  $\Delta$ 1N-Fc は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 2~5 番目のイムノグロブリン様部位及び 6 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #1) 及びヒト抗体 Fc 領域から成る融合タンパク質に相当する。

pBS-KDR-5D1N (抗原の調製(8)参照) の XbaI/NotI (1.4kbp) 断片及び pAMoAPRFc (抗原の調製(1)参照) 上のヒト抗体の Fc 領域をコードする SnaBI/NotI (0.7kbp) をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5  $\Delta$ 1N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクター pVL-KDR-5  $\Delta$ 1N-Fc を構築した。

(10) 可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4  $\Delta$ 1N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクターの構築

可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4N-Fc (抗原の調製(4)参照) から、N 末端側から 1 番目のイムノグロブリン様部位を形成する 31 番目のアミノ酸から 102 番目のアミノ酸までの計 72 個のアミノ酸を欠失させた KDR 断片、6 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #2) 及びヒト抗体 Fc 領域を構成する 227 アミノ酸から成る融合タンパク質 (以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4D1N-Fc と称す) を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4  $\Delta$ 1N-Fc は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 2~4 番

目のイムノグロブリン様部位及び 2 アミノ酸残基からなるリンカー(リンカー #2) 及びヒト抗体 Fc 領域から成る融合タンパク質に相当する。

抗原の調製(8)で回収した XbaI/BglII-PCR 断片(0.8 kbp)及び pVL-KDR-4N(抗原の調製(18)参照)の BglII/NotI(0.9 kbp)断片を pBluescriptII SK(-) の XbaI/NotI に挿入し、pBS-KDR-4  $\Delta$ 1N を作製した。pBS-KDR-4  $\Delta$ 1N の XbaI/KpnI(1.0 kbp)断片及び pAMoAPRFc(抗原の調製(1)参照)上のヒト抗体の Fc 領域をコードする SnaBI/NotI(0.7kbp)をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン(Polyhedrin)遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4  $\Delta$ 1N とヒト抗体 Fc 領域との融合遺伝子発現ベクターpVL-KDR-4  $\Delta$ 1N-Fc を構築した。

#### (11)可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N 発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する配列番号 35 記載の 19 アミノ酸及び成熟体ヒト VEGF 受容体 KDR である、配列番号 34 記載のアミノ酸配列1~738 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片(以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N と称す)及びリンカー由来の 2 アミノ酸残基を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域のN末端側から 7 個のイムノグロブリン様部位に相当する。

pBS-KDR-Xb-S(抗原の調製(1)参照)を SnaBI/BamHI で切断し、終止コドンと NotI 部位とを含む合成リンカー(配列番号 26 及び配列番号 27)を組み込み、pBS-KDR(Xb)-S-N を作製した。pBS-KDR-Xb-S-N の XbaI-NotI(2.3 kb)断片をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン(Polyhedrin)遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N 発現ベクターpVL-KDR-7N を作製した。

#### (12)可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N' 発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する配列番号 35 記載の 19 アミノ酸及び成熟体ヒト VEGF 受容体 KDR である、配列番号 34 記載のアミノ酸

配列1～714 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片(以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N' と称す)を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N' は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域のN末端側から7 個目のイムノグロブリン様部位の約 2/3 までに相当する。

pUC-KDR-Xb を *Stu*I 及び *Sph*I で切断し、終止コドン及び *Not*I 部位を含む合成リンカー(配列番号 31 及び配列番号 29)を挿入した。*Xba*I-*Not*I (2.2 kbp)断片をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン(Polyhedrin)遺伝子の転写開始点の下流 5'側 *Xba*I 及び 3'側 *Not*I 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N' 発現ベクターpVL-KDR-7N' を作製した。

#### (13)可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5N 発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する配列番号 35 記載の 19 アミノ酸及び成熟体ヒト VEGF 受容体 KDR である、配列番号 34 記載のアミノ酸配列1～518 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片(以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5N と称す)を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5N は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域のN末端側から5 個のイムノグロブリン様部位に相当する。

pUC-KDR-Xb の *Eco*RI-*Hinc*II (1.9kb)断片及び *Sna*BI 部位、終止コドン、*Not*I 部位を含む合成 DNA(配列番号 30 及び配列番号 31)を pBluescriptII SK(-)の *Eco*RI/*Not*I 部位に挿入し、pBS-KDR-5N を作製した。pBS-KDR-5N の *Xba*I-*Not*I (1.6 kb)断片をバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン(Polyhedrin)遺伝子の転写開始点の下流 5'側 *Xba*I 及び 3'側 *Not*I 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-5N 発現ベクターpVL-KDR-5N を作製した。

#### (14)可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4N 発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する配列番号 35 記載の 19 アミノ酸及び成熟体ヒト VEGF 受容体 KDR である、配列番号 34 記載のアミノ酸配列1～393 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片(以下、可溶性

ヒト VEGF 受容体 KDR-4N と称す) 及びリンカー由来の 2 アミノ酸残基を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4N は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 4 個のイムノグロブリン様部位に相当する。

pAMo-4N-Fc (抗原の調製(4)参照) の XbaI/KpnI (1.2 kb) 断片及び配列番号 32 及び配列番号 33 の塩基配列を有する合成リンカーをバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流 5' 側 XbaI 及び 3' 側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-4N 発現ベクター pVL-KDR-4N を作製した。

#### (15) 可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-3N 発現ベクターの構築

ヒト VEGF 受容体 KDR のシグナルペプチドを構成する配列番号 35 記載の 19 アミノ酸及び成熟体ヒト VEGF 受容体 KDR である、配列番号 34 記載のアミノ酸配列 1~294 番目に相当する可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 断片 (以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-3N と称す) 及びリンカー由来の 2 アミノ酸残基を発現するためのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-3N は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域の N 末端側から 3 個のイムノグロブリン様部位に相当する。

pBS-KDR-3N (抗原の調製(5)参照) の XbaI/SnaBI (1.2 kb) 断片、配列番号 26 及び配列番号 27 の塩基配列を有する合成リンカーをバキュロウイルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン (Polyhedrin) 遺伝子の転写開始点の下流 5' 側 XbaI 及び 3' 側 BglII 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-3N 発現ベクター pVL-KDR-3N を作製した。

#### (16) 可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7 $\Delta$ 1N 発現ベクターの構築

可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N (抗原の調製(14)参照) から、N 末端側から 1 番目のイムノグロブリン様部位を形成する 31 番目のアミノ酸から 102 番目のアミノ酸までの計 72 個のアミノ酸を欠失させた KDR 断片、6 アミノ酸残基からなるリンカー (リンカー #1) 及びヒト抗体 Fc 領域を構成する 227 アミノ酸から成る融合タンパク質 (以下、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7  $\Delta$ 1N と称す) を発現するた

めのベクターを以下の手順で作製した。可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7  $\Delta$ 1N は、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の細胞外領域のN末端側から 2～7 番目のイムノグロブリン様部位及び 6 アミノ酸残基からなるリンカー(リンカー #1)から成る融合タンパク質に相当する。

pBS-KDR-5  $\Delta$ 1N(抗原の調製(9)参照)の XbaI/HincII(1.6kbp)断片及び pVL-KDR-7N(抗原の調製(14)参照)の HincII/NotI(0.67kbp)断片をバキュロウィルス組み換え pVL1393 プラスミドのポリヘドリン(Polyhedrin)遺伝子の転写開始点の下流 5'側 XbaI 及び 3'側 NotI 部位に組み込み、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7D1N 発現ベクターpVL-KDR-7D1N を作製した。

(17)昆虫細胞による可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 発現を行うための組み換えウィルスの作製

昆虫細胞による蛋白質の生産には目的遺伝子を組み込んだ組み換えウィルスの作製が必要であるが、その作製にはトランスファーベクターと呼ばれる目的蛋白質をコードする cDNA を特殊なプラスミドに組み込む過程と野生型ウィルスとトランスファーベクターを昆虫細胞にコトランスフェクションし、相同組み換えにより組み換えウィルスを取得する過程を経る。以上の過程についてファーマンジェン社製バキュロゴールドスターターキット(製品番号 PM-21001K )を用いてそのマニュアルに従い以下の手順で行った。

TMN-FH インセクトメディウム(ファーマンジェン社製)にて培養した昆虫細胞 Sf9(ファーマンジェン社製)に線状バキュロウィルス DNA[バキュロゴールド・バキュロウィルス DNA(BaculoGold baculovirus DNA)、ファーマンジェン社製]および作製したトランスファーベクターDNA をリポフェクチン法で導入すること[蛋白質核酸酵素、37, 2701(1992)]により行い組み換えバキュロウィルスを以下のように作製した。

(1)で作製した発現ベクターの 1  $\mu$ g と線状バキュロウィルス DNA の 20ng とを 12  $\mu$ l の蒸留水に溶解し、さらにリポフェクチン 6  $\mu$ l と蒸留水 6  $\mu$ l とを混和したものに加え室温で 15 分間放置した。一方 Sf9 細胞  $1 \times 10^6$  個を 2ml の Sf900-II 培地[ギブコ(Gibco)社製]に懸濁し、直径 35mm の細胞培養用プラスチックシ

シャーレに入れた。ここに上記のプラスミド DNA、線状バキュロウイルス DNA およびリポフェクチン混和溶液全量を加え 27℃で 3 日間培養後、組み換えウイルスを含む培養上清 1ml を採取した。シャーレには新たに Sf900-II 培地 1ml を加え、さらに 27℃で 3 日間培養し組み換えウイルスを含む培養上清をさらに 1.5ml 得た。さらに、(2)～(16)で作製した発現ベクターを用い同様の操作を行った。

次に蛋白質発現に用いるために得られた組み換えウイルスを各々、以下の手順で増殖させた。

Sf9 細胞  $2 \times 10^7$  個を 10ml の Sf900-II 培地に懸濁し、175cm<sup>2</sup> フラスコ(グライナー社製)に入れて室温で 1 時間放置して細胞をフラスコに付着させた。放置後上清を除き新たに 15ml の TMN-FH インセクトメディウムと上記の組み換えウイルスを含む培養上清のうち 1ml を加え 27℃で 3 日間培養した。培養後上清を 1,500×g で 10 分間遠心分離して細胞を除き、蛋白質発現に使用する組み換えウイルス溶液を得た。

得られた組み換えウイルス溶液についてウイルスの力価をバキュロゴールドスターキット・マニュアル(ファーマンジェン社製)に記載の方法で算定した。

Sf9 細胞  $6 \times 10^6$  個を 4ml の Sf900-II 培地に懸濁し、直径 60mm の細胞培養用プラスチックシャーレに入れ、室温で 1 時間放置して細胞をシャーレに付着させた。次に上清を除き新たに Sf900-II 培地 400  $\mu$ l と Sf900-II 培地で 1000 倍に希釈した上記組み換えウイルス溶液を加え室温で 1 時間放置した後、培地を除き 5ml の 1%低融点アガロース[アガーブラーク・アガロース(Agarplaque Agarose)、ファーマンジェン社製]を含む培地[滅菌した 1ml の 5%アガーブラーク・アガロース水溶液と 4ml の TMN-FH インセクトメディウムを混和し、42℃に保温したもの]を該シャーレに流し込んだ。室温で 15 分間放置した後、乾燥を防ぐためビニルテープをシャーレにまき、密閉可能なプラスチック製容器に該シャーレを入れ、27℃で 6 日間培養した。該シャーレに 0.01% ニュートラルレッドを含む PBS 1ml を加えさらに 1 日培養した後、出現したブラークの数を数えた。以上の操作より該組み換えウイルス溶液はいずれも約  $1 \times 10^7$  ブラークフォーミングユニット(以下、PFU と称す)/ml のウイルスを含んでいることがわかった。



(18) 昆虫細胞における可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体、および、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 各種誘導体の発現、精製

1 (1)～(16)で示した可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体、および、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 各種誘導体は以下のようにして得た。High Five 細胞  $4 \times 10^7$  個を  $175\text{cm}^2$  フラスコ(グライナー社製)中の EX-CELL™400 培地(JRH Bioscience 社製)30ml に懸濁し、室温で 1 時間放置し、フラスコに付着させた。1(1)～(16)で得られたトランスファーベクター由来の組み換えウィルスを約  $1 \sim 3 \times 10^8$  PFU /ml の濃度で含む溶液を 1ml 加え、室温で 2 時間感染させた。培養上清を除き新たに 30ml の EX-CELL™400 培地 30ml を加え  $27^\circ\text{C}$  にて 3～4 日間培養した。培養終了後、培養上清を回収し  $1,500 \times g$  で 10 分間遠心分離を行い上清を得た。

可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体については、プロセップ A カラムを用いて以下のように精製した。

カラムに約 1ml のプロセップ A[Bioprocessing 社製]を充填し、10ml の 20mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.2)を用いて 1ml/分の流速でカラムを洗浄した。洗浄後、上記のように調整した可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR を含む培養液 500～1000ml を 100ml/時の流速でプロセップ A カラムに通塔した。さらに 10ml の 20mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH7.2)を用いて 1ml/分の流速で洗浄した後、50mM クエン酸緩衝液(pH3)を 7ml 通塔し、プロセップ A カラムに吸着した蛋白質の溶出を行った。各分画に含まれる蛋白質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)にて解析した。

可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 各種誘導体については、以下のように精製した。

50ml の DEAE-Sepharose CL-6B(Pharmacia Biotech 社製)を充填したカラムが液の入口側に、40ml の Heparin Sepharose CL-6B(Pharmacia Biotech 社製)を充填したカラムが出口側になるように直列に接続し、300ml の 20mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH8)で洗浄した。洗浄後、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR を含む培養液 400～800ml を 50～100ml/時の流速で通塔した。更に、300ml の 20mM リン酸ナトリウム緩衝液(pH8)で洗浄した後、Heparin Sepharose CL-6B

カラムのみに 400ml の 0~1M NaCl/20mM リン酸ナトリウム緩衝液にて連続濃度勾配をかけ、吸着蛋白質の溶出を行った。溶出液は 7ml ずつ分画し、各分画に含まれる蛋白質を SDS-PAGE にて解析し、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR を含む分画を 60~80ml 回収した。回収した精製画分はセントリプレップ 10 (アミコン社製)を用いて濃縮し、可溶性ヒト KDR3N、KDR4N、KDR5N、KDR7N' および KDR7N を溶液としてそれぞれ 2.8ml、8ml、5.5ml、4ml および 4.8ml (蛋白質濃度/純度は 345.5  $\mu$ g/ml/30%、264  $\mu$ g/ml/50~60%、380.5  $\mu$ g/ml/70%、1.59mg/ml/60%および 815  $\mu$ g/ml/70~80%) 得た。

取得した可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体、および、可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR 各種誘導体の模式図は第 12 図および第 13 図に示した。

#### (19) 可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR の純度の確認

精製可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc の純度を SDS-PAGE を用いて確認した。SDS-PAGE は文献記載の方法 [Anticancer Research, 12, 1121 (1992)] に従った。ゲルには 5~20% グラジエントゲル (アトー社製) を用い、還元条件下でレーンあたりのタンパク質量として 2  $\mu$ g の KDR-Fc それぞれ泳動し、クーマシーブリリアントブルーにて染色した。第 14 図に結果を示した。KDR-7N-Fc、KDR-5N-Fc、KDR-4N-Fc、KDR-3N-Fc、KDR-2N-Fc、KDR-1N-Fc、KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc、KDR-4 $\Delta$ 1N-Fc の純度は 95% 以上であった。

#### (20) 対照抗原蛋白質の精製

対照抗原蛋白質は以下のようにして得た。High Five 細胞  $4 \times 10^7$  個を 175cm<sup>2</sup> フラスコ (グライナー社製) 中の EX-CELL™400 培地 (JRH Bioscience 社製) 30ml に懸濁し、室温で 1 時間放置し、フラスコに付着させ、27℃にて 3~4 日間培養した。培養終了後、培養上清を回収し、1,500 $\times$ g で 10 分間遠心分離を行い、上清を得た。

カラムにヘパリンーセファロース CL-6B ゲル (Pharmacia Biotech AB 社製) 約 20ml を充填し、200ml の 20mM トリスー塩酸 (pH7.5) 緩衝液で 0.5ml/分の流速で洗浄した。洗浄後、上記のように調製した High Five 細胞の培養液 500ml を 0.5ml/分の流速でヘパリンーセファロース CL-6B カラムに通塔した。さらに

200ml の 0.2M NaCl を含む 20mM トリスー塩酸(pH7.5)で 0.5ml/分の流速で洗浄した後、1M NaCl を含む 20mM トリスー塩酸(pH7.5)からなる緩衝液を 200 ml 通塔し、ヘパリンーセファロースに吸着した蛋白質を溶出した。1M NaCl 溶出画分をセントリプレップ 10 (アミコン社製)を用いて濃縮し対照抗原蛋白質を蛋白質濃度 867  $\mu$ g/ml の溶液として 7 ml 得た。

(21) 可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体のヒト VEGF 結合活性の確認

(18)で取得した可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体(KDR-7N-Fc, KDR-5N-Fc, KDR-4N-Fc, KDR-3N-Fc, KDR-2N-Fc, KDR-1N-Fc, KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc, KDR-4 $\Delta$ 1N-Fc, KDR-2 $\Delta$ 1N-Fc)のヒト VEGF 結合活性を以下の(21-1)VEGF 結合阻害試験、(21-2)VEGF 結合試験により確認した。

#### (21-1)VEGF 結合阻害試験

96 ウェル・イムオビロン<sup>TM</sup> - P フィルトレーション・プレート (96-well Immobilon<sup>TM</sup>-P Filtration Plate ;ミリポア社製)にメタノールを 100  $\mu$  l/ウェルで分注し、プレート底部の PVDF 膜を親水化した。水で洗浄後、PBS 希釈 4  $\mu$  g/ml 可溶性ヒト KDR-7N-Fc を 50  $\mu$  l/ウェルで分注し、4  $^{\circ}$ C で一晚放置して吸着させた。洗浄後、1%牛血清アルブミン(BSA) を含む PBS を 200  $\mu$  l/ ウェル加え、室温 30 分間反応させて残っている活性基をブロックした。PBS で洗浄後、(18)で取得した精製可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体(KDR-7N-Fc, KDR-5N-Fc, KDR-4N-Fc, KDR-3N-Fc, KDR-2N-Fc, KDR-1N-Fc, KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc, KDR-4 $\Delta$ 1N-Fc, KDR-2 $\Delta$ 1N-Fc)を 50  $\mu$  l/ウェルで分注し(最終濃度 0.05~6.25  $\mu$  g/ml)、さらに、<sup>125</sup>I 標識ヒト VEGF (最終濃度 4ng/ml:アマシャム社製)を 50  $\mu$  l/ウェル加え、室温で 1.5 時間反応させた。0.05% tween-PBS で洗浄後、50 $^{\circ}$ C にてウェルを乾燥させ、マイクロシンチ-0 (パッカード社製)を 10  $\mu$  l/ウェル加え、トップカウント(パッカード社製)を用いて、各ウェルに結合した <sup>125</sup>I 標識ヒト VEGF の放射活性を測定した。

結果を第 15A 図に示す。KDR-7N-Fc, KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc, KDR-5N-Fc, KDR-4 $\Delta$ 1N-Fc, KDR-4N-Fc は濃度依存的に <sup>125</sup>I 標識ヒト VEGF の可溶性ヒ

ト KDR7N-Fc への結合を阻害することが示された。一方、KDR-3N-Fc、KDR-2N-Fc、KDR-1N-Fc、KDR-2 $\Delta$ 1N-Fc は全く結合阻害活性を示さなかった。結合阻害活性の強さは、KDR-7N-Fc > KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc > KDR-5N-Fc > KDR-4 $\Delta$ 1N-Fc > KDR-4N-Fc の順番であった。従って、VEGF の KDR への結合には、少なくとも N 末から 1 番目、6 番目、7 番目の Ig 様ドメインは関与しないことが示された。また、N 末から 2、3、4 番目の Ig 様ドメイン(N末端アミノ酸から 103～393 番目)があれば VEGF に結合できることが示された。

#### (21-2) VEGF 結合試験

96 ウェル・イムオビロン<sup>TM</sup> - P フィルトレーション・プレート (96-well Immobilon<sup>TM</sup>-P Filtration Plate ; ミリポア社製) にメタノールを 100  $\mu$  l/ウェルで分注し、プレート底部の PVDF 膜を親水化した。水で洗浄後、PBS 希釈した 0.1～12.5  $\mu$  g/ml の (18) で取得した精製可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体 (KDR-7N-Fc, KDR-5N-Fc, KDR-4N-Fc, KDR-3N-Fc, KDR-2N-Fc, KDR-1N-Fc, KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc, KDR-4 $\Delta$ 1N-Fc, KDR-2 $\Delta$ 1N-Fc) を 50  $\mu$  l/ウェルで分注し、4  $^{\circ}$ C で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1% 牛血清アルブミン (BSA) を含む PBS を 200  $\mu$  l/ウェル加え、室温 3 分間反応させて残っている活性基をブロックした。PBS で洗浄後、<sup>125</sup>I 標識ヒト VEGF (最終濃度 4 ng/ml: アマシヤム社製) を 50  $\mu$  l/ウェル加え、室温で 1.5 時間反応させた。0.05% tween-PBS で洗浄後、50 $^{\circ}$ C にてウェルを乾燥させ、マイクロシンチ-0 (パッカード社製) を 10  $\mu$  l/ウェル加え、トップカウント (パッカード社製) を用いて、各ウェルに結合した <sup>125</sup>I 標識ヒト VEGF の放射活性を測定した。

結果を第 15B 図に示す。KDR-7N-Fc、KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc、KDR-5N-Fc、KDR-4 $\Delta$ 1N-Fc、KDR-4N-Fc は濃度依存的に <sup>125</sup>I 標識ヒト VEGF に結合することが示された。一方、KDR-3N-Fc、KDR-2N-Fc、KDR-1N-Fc、KDR-2 $\Delta$ 1N-Fc は全く結合活性を示さなかった。結合活性の強さは、KDR-7N-Fc > KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc = KDR-5N-Fc > KDR-4 $\Delta$ 1N-Fc > KDR-4N-Fc の順番であった。従って、VEGF の KDR への結合には、少なくとも N 末から 1 番目、6 番目、7 番目の Ig 様ドメインは関与しないことが示された。また、N 末から 2、3、4 番目の

Ig 様ドメイン(N末端アミノ酸から 103 から 393 番目)があれば VEGF に結合できることが示された。

## (22) 昆虫細胞におけるヒト VEGF の発現

ヒト VEGF は以下のようにして得た。High Five 細胞  $4 \times 10^7$  個を  $175\text{cm}^2$  フラスコ(グライナー社製)に EX-CELL™400 培地(JRH Bioscience 社製)30ml に懸濁し、室温で 1 時間放置し、フラスコに付着させた。文献[Cell Growth & Differentiation, 7, 213 (1996)]記載の方法により得られたヒト VEGF 組み換えバキュロウィルス溶液を約  $1 \sim 3 \times 10^8$  PFU/ml の濃度で含む溶液を 1ml 加え、室温で 2 時間感染させた。培養上清を除き新たに 30ml の EX-CELL™400 培地 30ml を加え  $27^\circ\text{C}$  にて 3~4 日間培養した。培養終了後、培養上清を回収し  $1,500 \times g$  で 10 分間遠心分離を行い上清を得た。

カラムに約 40ml のヘパリンセファロース CL-6B ゲル[ファルマシア・バイオテック(Pharmacia Biotech) AB 社製]を充填し、400ml の 20mM トリス塩酸(pH7.5)からなる緩衝液を用いて 0.5ml/分の流速で洗浄した。洗浄後、上記のように調製したヒト VEGF を含む培養液 1500ml を 0.5ml/分の流速でヘパリンセファロース CL-6B カラムに通塔した。さらに 400ml の 20mM トリス塩酸(pH7.5)を用いて 0.5ml/分の流速で洗浄した後、0.2M、0.5M および 1M の NaCl 含有 20mM トリス塩酸(pH7.5)からなる緩衝液各 120 ml を順次通塔し、ヘパリンセファロースに吸着した蛋白質を段階的に溶出を行うと共に 8ml ずつ溶出液を分画した。各分画に含まれる蛋白質を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて解析し、ヒト VEGF を含む分画(0.5~1M NaCl 画分)を 120ml 回収した。セントリプレップ-10(アミコン社製)で濃縮後、ヒト VEGF を溶液として 4ml(蛋白質濃度 1.2mg/ml)得た。

## 2. 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

1(18)で得られた各種抗原  $10 \sim 50 \mu\text{g}$  をそれぞれアルミニウムゲル 2mg および百日咳ワクチン(千葉県血清研究所製)  $1 \times 10^9$  細胞とともに 5 週令雌 BALB/c (日本 SLC 社製)、B6C3F1 マウス(日本チャールズリバー社製)あるいは雌 SD ラット(日本 SLC 社製)に投与し、2 週間後より  $10 \sim 50 \mu\text{g}$  の蛋白質を 1 週間に

1 回、計 4 回投与した。また、NIH3T3-KDR 細胞  $1 \times 10^7$  個を 5 週令雌 BALB/c (日本 SLC 社製) 3 匹に投与し、計 6 回投与した。眼底静脈叢、心臓、あるいは、尾静脈より採血し、その血清抗体価を以下に示す酵素免疫測定法で調べ、3. で示す酵素免疫測定法により十分な抗体価を示したマウスあるいはラットから最終免疫 3 日後に脾臓を摘出した。なお、NIH3T3-KDR 細胞を投与した 5 週令雌 BALB/c では免疫がかからず、可溶性 KDR に対する抗体価は上昇しなかった。

脾臓を MEM 培地 (日水製薬社製) 中で細断し、ピンセットでほぐし、遠心分離 (1,200rpm、5 分間) した後、上清を捨て、トリス-塩化アンモニウム緩衝液 (pH7.65) で 1~2 分間処理し赤血球を除去し、MEM 培地で 3 回洗浄し、細胞融合に用いた。

### 3. 酵素免疫測定法

1(18) で得られた可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体、KDR 各種誘導体を免疫したマウスあるいはラットに由来する抗血清およびハイブリドーマの培養上清の測定に関しては、抗原として、1(18) の昆虫細胞培養上清より得られた可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体、KDR 各種誘導体を用いた。96 ウェルの EIA 用プレート (グライナー社製) に、PBS 希釈 1~10  $\mu$ g/ml 可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体、KDR 各種誘導体および対照抗原として 1(20) で得られた High Five 細胞培養上清のヘパリンカラム吸着画分、あるいは、抗 GD3 マウスヒトキメラ抗体 KM871 [Cancer Immunology and Immunotherapy, 36, 373 (1993)] をそれぞれ 50  $\mu$ l/ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1% 牛血清アルブミン (BSA) を含む PBS を 100  $\mu$ l/ウェル加え、室温 1 時間反応させて残っている活性基をブロックした。1% BSA-PBS を捨て、被免疫マウスあるいは被免疫ラット抗血清およびハイブリドーマの培養上清を 50  $\mu$ l/ウェルで分注し 2 時間反応させた。0.05% tween-PBS で洗浄後、ペルオキシダーゼ標識ウサギ抗マウスイムノグロブリンあるいはペルオキシダーゼ標識ウサギ抗ラットイムノグロブリン (ともに DAKO 社製) を 50  $\mu$ l/ウェルで加えて室温、1 時間反応させ、0.05% tween-PBS で洗浄後 ABTS 基

質液[2,2-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸)アンモニウム]を用いて発色させ OD415nm の吸光度 E max[モレキュラー・デバイシズ(Molecular Devices)社製]を測定した。

#### 4. マウス骨髄腫細胞の調製

8-アザガニン耐性マウス骨髄腫細胞株 P3-U1 を正常培地で培養し、細胞融合時に  $2 \times 10^7$  以上の細胞を確保し、細胞融合に親株として供した。

#### 5. ハイブリドーマの作製

2. で得られたマウス脾細胞あるいはラット脾細胞と 4. で得られた骨髄腫細胞とを 10:1 になるよう混合し、遠心分離(1,200rpm、5 分間)した後、上清を捨て、沈澱した細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、37℃で、ポリエチレングライコール-1000(PEG-1000)2g、MEM 培地 2ml および DMSO 0.7ml の混液 0.2 ~ 1ml/ $10^6$  マウス脾細胞を加え、1~2 分間毎に MEM 培地 1~2ml を数回加えた後、MEM 培地を加えて全量が 50ml になるようにした。遠心分離(900rpm、5 分間)後、上清を捨て、ゆるやかに細胞をほぐした後、メスピペットによる吸込み、吸出しでゆるやかに細胞を HAT 培地 100ml 中に懸濁した。

#### 6. Binding ELISA によるハイブリドーマスクリーニング

5. で得られた懸濁液を 96 ウェル培養用プレートに 100  $\mu$  l/ウェルずつ分注し、5%CO<sub>2</sub> インキュベーター中、37℃で 10~14 日間 5%CO<sub>2</sub> 下で培養した。この培養上清を参考例2の 3 に記載した酵素免疫測定法で調べ、参考例2 1(18)で得られた可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体、KDR 各種誘導体に特異的に反応し、かつ 1(20)で得られた対照抗原に反応しないウェルを選び、さらに HT 培地と正常培地に換え、2 回クローニングを繰り返して、抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体を生産するハイブリドーマ株を確立した。以下にその結果を示す。

表 4

動物	匹数	免疫原	スクリーニング原	スクリーニング法	スクリーニングしたウエル数	確立したハイブリドーマ株
SDラット	3	KDR(7N)	KDR(7N)	Binding ELISA	3024	4 (KM1860~1863)
SDラット	2	KDR(7N)	KDR(7N)		2016	1 (KM1867)
Balb/cマウス	1	KDR(2N)-Fc	KDR(7N)		420	7 (KM1859~1865)
Balb/cマウス	1	KDR/NIH3T3 cell	KDR(7N)		504	1 (KM1859)
Balb/cマウス	1	KDR(7N)	KDR(7N)		420	1 (KM1864)
Balb/cマウス	1	KDR(7N)	KDR(7N)-Fc		420	2 (KM1865, 1666)
Balb/cマウス	2	KDR(7N)	KDR(2N)-Fc		840	1 (KM1868)
Balb/cマウス	2	KDR(2N)-Fc	KDR(7N)		840	1 (KM1768)
Balb/cマウス	2	KDR(7N)	KDR(3N)-Fc		840	2 (KM1825, 1826)
Balb/cマウス	2	KDR(7N)	KDR(5N)-Fc		840	4 (KM1827~1830)
Balb/cマウス	2	KDR(7N)	KDR(5N)		840	14 (KM1831~1838, 1853~1858)
Balb/cマウス	4	KDR(5N)	KDR(5N)		1680	10 (KM1843~1950, 1932, 1933)
Balb/cマウス	1	KDR(7N)	KDR(7N)		420	3 (KM1778~1780)
Balb/cマウス	1	KDR(7N)-Fc	KDR(5N)		504	3 (KM1987~1989)
Balb/cマウス	1	KDR(5N)-Fc	KDR(5N)		420	1 (KM1942)
Balb/cマウス	3	KDR(5N)	KDR(5N)		1260	8 (KM1943~1950)
Balb/cマウス	3	KDR(7N)-Fc	KDR(5 $\Delta$ 1N)-Fc		1260	11 (KM1965~1975)
B6C3F1マウス	1	KDR(7N)-Fc	KDR(5 $\Delta$ 1N)-Fc/RI	VEGF-KDR結合阻害試験	420	0
B6C3F1マウス	1	KDR(5 $\Delta$ 1N)-Fc	KDR(7N)-Fc/RI		420	7 (KM1991~1997)



1(18)で得られた可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体、KDR 各種誘導体および KDR-NIH3T3 細胞を免疫した Balb/c マウス、B6C3F1 マウス、あるいは SD ラット計 32 匹から得られたハイブリドーマを約 16548 ウェルスクリーニングし、1(18)で得られた可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-Fc 各種誘導体、KDR 各種誘導体に特異的に反応し、かつ 1(20)で得られた対照抗原あるいは KM871 に反応しない計 74 クローン of 抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体を取得し、それぞれ表4のように命名した。これらの抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体の中で、40 個のモノクローナル抗体(KM1668、1768、1825、1826、1827、1828、1829、1831、1835、1837、1853、1856、1857、1859、1860、1861、1862、1863、1864、1865、1933、1942、1943、1944、1945、1946、1947、1948、1949、1950、1987、1988、1989、1858、1832、1833、1834、1836、1838、1932)が免疫細胞染色法により細胞表面上の KDR に反応することが示された。しかし、血管内皮細胞の VEGF 刺激による増殖促進活性を阻害する活性を示すような KDR の生物活性を阻害するモノクローナル抗体は取得できなかった。

#### 7. モノクローナル抗体のエピトープ解析

6.で述べた抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体の特異性をハイブリドーマ培養上清を用いて 3.に記載した酵素免疫測定法を用いて確認した。

代表的な結果を第 16 図に、まとめた結果を第 17 図に示す。上記 74 種のモノクローナル抗体のうち、KM1668 他 32 種が 1 番目の Ig 様ドメイン(1~104 アミノ酸に対応)に反応し、KM1987 他 3 種が 1 番目の Ig 様ドメイン(1~104 アミノ酸に対応)と 2 番目の Ig 様ドメイン(105~194 アミノ酸に対応)の間に反応し、KM1855 他 5 種が 2 番目の Ig 様ドメイン(105~194 アミノ酸に対応)に反応し、KM1858 他 2 種が 3 番目の Ig 様ドメイン(195~294 アミノ酸に対応)に反応し、KM1854 他 3 種が 4 番目の Ig 様ドメイン(295~393 アミノ酸に対応)に反応し、KM1832 他 14 種が 5 番目の Ig 様ドメイン(394~518 アミノ酸に対応)に反応し、KM1665 他 2 種が 6~7 番目の Ig 様ドメイン(519~738 アミノ酸に対応)に反応した。従って、1 番目の Ig 様ドメインに対する免疫原性の高いモノクローナル抗体の 43%が 1 番目の Ig 様ドメインに反応した。1(21)で示したように KDR の 1

番目の Ig 様ドメインは VEGF の結合活性に関与しないが、免疫原性が高いため、ELISA スクリーニングでは中和活性を示すモノクローナル抗体の作製が困難であると推定された。

#### 8. [ $^{125}$ I] VEGF-KDR 結合阻害アッセイによる抗体価の測定

免疫原性が高く、中和活性に関係のない 1 番目の Ig 様ドメインに対するモノクローナル抗体を排除するため、1(18)で得られた KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc をマウスに免疫した。マウス抗血清のヒト VEGF とヒト VEGF 受容体 KDR の結合阻害活性を以下の手順に従い評価した。

96 ウェル・マルチスクリーン-IPプレート(96-well MultiScreen-IP Plate; ミリポア社製)にメタノールを 100  $\mu$  l/ウェルで分注し、プレート底部の PVDF 膜を親水化した。水で洗浄後、PBS で 4  $\mu$  g/ml の濃度に希釈した可溶性ヒト VEGF 受容体 KDR-7N-Fc を 50  $\mu$  l/ウェルで分注し、4℃で一晩放置して吸着させた。洗浄後、1%牛血清アルブミン(BSA) 含有 PBS を 200  $\mu$  l/ウェル加え、室温 30 分間反応させて残っている活性基をブロックした。PBS で洗浄後、1%BSA-PBS 溶液で 100、1000、10000 倍に希釈した抗血清、1%BSA-PBS 溶液で希釈した精製モノクローナル抗体(0.01~25  $\mu$  g/ml)、あるいは、ハイブリドーマの培養上清を 50  $\mu$  l/ウェルで分注し、さらに、4 ng/ml の  $^{125}$ I 標識ヒト VEGF (アマシヤム社製)を 50  $\mu$  l/ウェル加え室温で 1.5 時間反応させた。

0.05%Tween-PBS で洗浄後、50℃にてウェルを乾燥させ、マイクロシンチ-0 (パッカード社製)を 10  $\mu$  l/ウェル加え、トップカウント(パッカード社製)を用いて、各ウェルに結合した  $^{125}$ I 標識ヒト VEGF の放射活性を測定した。

ハイブリドーマの培養上清の活性を検討した結果を表5に示した。

表 5

	Serum Dilution	% Inhibition		
		1/10000	1/1000	1/100
Immunogen	Mouse #			
Control		0	2.6	0
KDR7N-Fc	#B	0.35	0	47.7
	#C	16.1	6.7	53.8
	#D	7.8	10.5	56.8
KDR5N	#A	9.7	3.4	16.5
	#C	14.1	0	1.1
	#3	1	0	19.2
KDR5N-Fc	#B	5.7	14.7	51.5
	#A	7.2	6	58.7
KDR5 $\Delta$ 1N-Fc	#1	11.7	16.2	56.6
	#2	11.6	15.8	46.9
	#3	7.9	34.3	76.3
KDR2N-Fc	#1	0	2.6	27.6
	#2	1.4	0.5	36.2

KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc 免疫したマウス 3 匹の抗血清は全て 100 倍希釈において 50%以上の結合阻害活性を示し、3 匹中 1 匹の抗血清は 1000 倍希釈において 34.3%と最も強い結合阻害活性を示した。KDR-7N-Fc, KDR-5N-Fc 免疫マウスそれぞれ 3 匹、2 匹の抗血清は 100 倍希釈において 50%以上の結合阻害活性を示した。従って、結合阻害活性が最も強く、さらに、免疫原性の強い 1 番目の Ig 様ドメインを含まない KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc が免疫原として適することが示された。

#### 9. [<sup>125</sup>I] VEGF-KDR 結合阻害アッセイによるハイブリドーマのスクリーニング

KDR-5N-Fc 免疫マウス 1 匹よりハイブリドーマを作製し、得られた約 672 ウェルの培養上清を用いて 8.で示した [<sup>125</sup>I] VEGF-KDR 結合阻害アッセイでスクリーニングしたところ、培養上清では 90.1、66.7、59.0、85.7、86.8、78.0、91.2%

の結合阻害活性を示す 7 クローンのモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得、これらをそれぞれ KM1991～1997 と命名した(表 4)。

#### 10. モノクローナル抗体 KM1991～1997 のエピトープ解析

9. で述べた抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体の特異性を精製抗体 5  $\mu$ g/ml を用いて 3 に記載した酵素免疫測定法を用いて確認した。

代表的な結果を第 18 図に、まとめた結果を第 17 図に示す。KM1992、KM1995 に代表される上記 7 種のモノクローナル抗体は全て 4 番目の Ig 様ドメイン(295～393 アミノ酸に対応)に反応した。従って、KDR の N 末端から 4 番目の Ig 様ドメイン(295～393 アミノ酸に対応)が VEGF との結合に特に重要であることが示された。特に、KM1991、KM1992、KM1993、KM1994 および KM1995 は、13. に示した VEGF 受容体 KDR の自己リン酸化阻害活性、あるいは、14. に示した VEGF 依存的血管内皮細胞の増殖阻害活性を示し、KDR の生物活性を阻害する中和モノクローナル抗体であることが示された。6. で取得された計 74 クローンの抗ヒト VEGF 受容体 KDR モノクローナル抗体では、KDR の生物活性を阻害する中和モノクローナル抗体を取得することができなかったのに対し、9. では中和モノクローナル抗体が取得できたことから、免疫原性の強い 1 番目の Ig 様ドメインを含まない KDR-5 $\Delta$ 1N-Fc が免疫原として適すること、 $[^{125}\text{I}]$ VEGF-KDR 結合阻害アッセイがハイブリドーマスクリーニング系として適することが明らかとなった。

モノクローナル抗体の抗体クラスを決めるためにサブクラスタイピングキット[ザイメット(Zymed)社製]を用いた酵素免疫測定法を行った。その結果を以下の表 6 に示す。

表 6

抗体クラス	KM番号
IgG1	1665, 1666, 1668, 1768, 1778-1780, 1825-1829, 1831, 1838, 1853-1858, 1862, 1863, 1865, 1943-1950, 1965, 1967, 1968, 1971-1975, 1987-1989, 1992, 1994
IgG2a	1830, 1859-1861, 1864, 1966, 1969, 1970
IgG2b	1993, 1995
IgG3	
IgM	1659, 1942
IgA	1664
IgE	1991, 1996, 1997

本発明で確立したモノクローナル抗体は IgM である KM1659、KM1942、IgA である KM1664、IgE である KM1991、KM1996、KM1997 を除き、すべて IgG クラスであった。

#### 産業上の利用可能性

本発明は、固形腫瘍の増殖もしくは転移形成、慢性関節リウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症および乾癬など血管新生の異常により病態が進行する疾患の診断あるいは治療に有用であるヒト VEGF 受容体 Flt-1 に特異的に結合するモノクローナル抗体とヒト VEGF 受容体 KDR に特異的に結合するモノクローナル抗体との組合せからなる薬剤により、固形腫瘍、慢性関節リウマチ、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症および乾癬などをより効果的に治療することができる。

## 配列フリーテキスト

配列番号1－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号2－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号3－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号4－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号5－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号6－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号7－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号8－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号9－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号10－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号11－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号12－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号13－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号14－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号15－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号16－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号17－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号18－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号19－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号20－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号21－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号22－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号23－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号24－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号25－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号26－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号27－人工配列の説明:合成 DNA

配列番号28－人工配列の説明：合成 DNA

配列番号29－人工配列の説明：合成 DNA

配列番号30－人工配列の説明：合成 DNA

配列番号31－人工配列の説明：合成 DNA

配列番号32－人工配列の説明：合成 DNA

配列番号33－人工配列の説明：合成 DNA

## 請求の範囲

1. ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を介する情報伝達を阻害する物質とヒト VEGF 受容体 KDR を介する情報伝達を阻害する物質との組み合わせからなる医薬。
2. ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を介する情報伝達を阻害する物質とヒト VEGF 受容体 KDR を介する情報伝達を阻害する物質との組み合わせからなる VEGF 活性阻害剤。
3. ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を介する情報伝達を阻害する物質とヒト VEGF 受容体 KDR を介する情報伝達を阻害する物質との組み合わせからなる血管新生阻害剤。
4. ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を介する情報伝達を阻害する物質とヒト VEGF 受容体 KDR を介する情報伝達を阻害する物質との組み合わせからなる異常な血管新生により病態が進行する疾患の治療薬。
5. 異常な血管新生により病態が進行する疾患が、固形腫瘍の増殖、転移形成、慢性関節リュウマチにおける関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、乾癬である請求の範囲4記載の治療薬。
6. ヒト VEGF 受容体 Flt-1 を介する情報伝達を阻害する物質が、VEGF の Flt-1 受容体結合を阻害する物質、または Flt-1 受容体からの情報伝達を阻害する物質である請求の範囲1～5から選ばれる薬剤。
7. VEGF の Flt-1 受容体結合を阻害する物質が、ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に対するモノクローナル抗体および該抗体断片から選ばれる請求の範囲6記載の薬剤。
8. ヒト VEGF 受容体 Flt-1 に対するモノクローナル抗体が、ハイブリドーマ KM1750(FERM BP-5700)の生産するマウス IgG2b サブクラスに属するモノクローナル抗体、またはハイブリドーマ KM1732(FERM BP-5698)の生産するマウス IgG1 サブクラスに属するモノクローナル抗体である請求の範囲7記載の薬剤。
9. Flt-1 受容体からの情報伝達を阻害する物質が、Flt-1 チロシンキナーゼ阻害活性を有する物質および p38 阻害活性を有する物質から選ばれる請求



の範囲6記載の薬剤。

10. ヒト VEGF 受容体 KDR を介する情報伝達を阻害する物質が、VEGF の KDR 受容体結合を阻害する物質、または KDR 受容体からの情報伝達を阻害する物質である請求の範囲1～5から選ばれる薬剤。

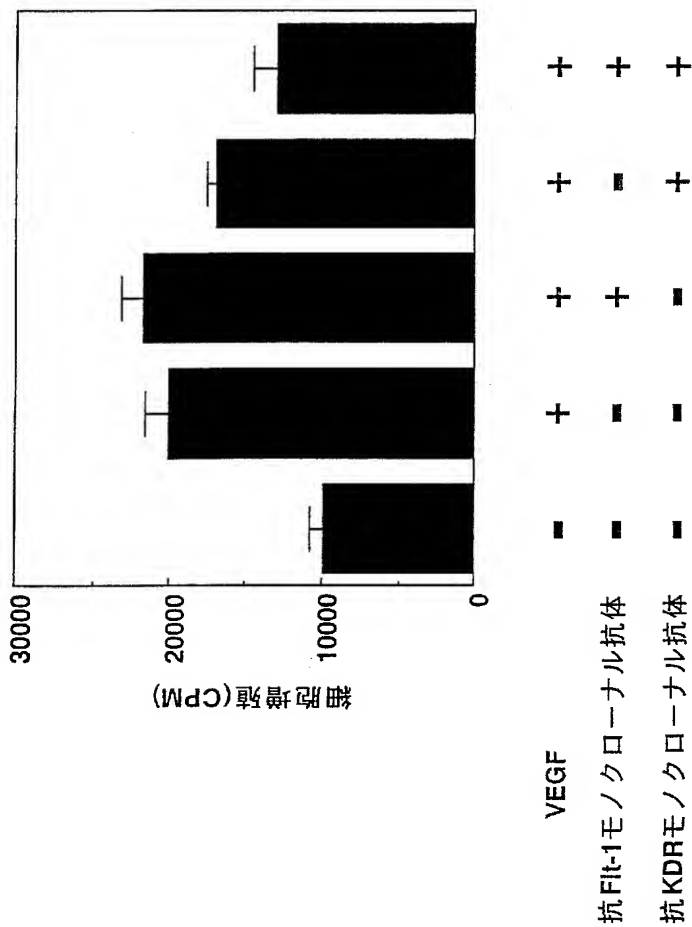
11. VEGF の KDR 受容体結合を阻害する物質が、ヒト VEGF 受容体 KDR に対するモノクローナル抗体および該抗体断片から選ばれる請求の範囲 10 に記載の薬剤。

12. ヒト VEGF 受容体 KDR に対するモノクローナル抗体が、ハイブリドーマ KM1992(FERM BP-6217)の生産するマウス IgG1 サブクラスに属するモノクローナル抗体、またはハイブリドーマ KM1995(FERM BP-6218)の生産するマウス IgG2b サブクラスに属するモノクローナル抗体である請求の範囲11に記載の薬剤。

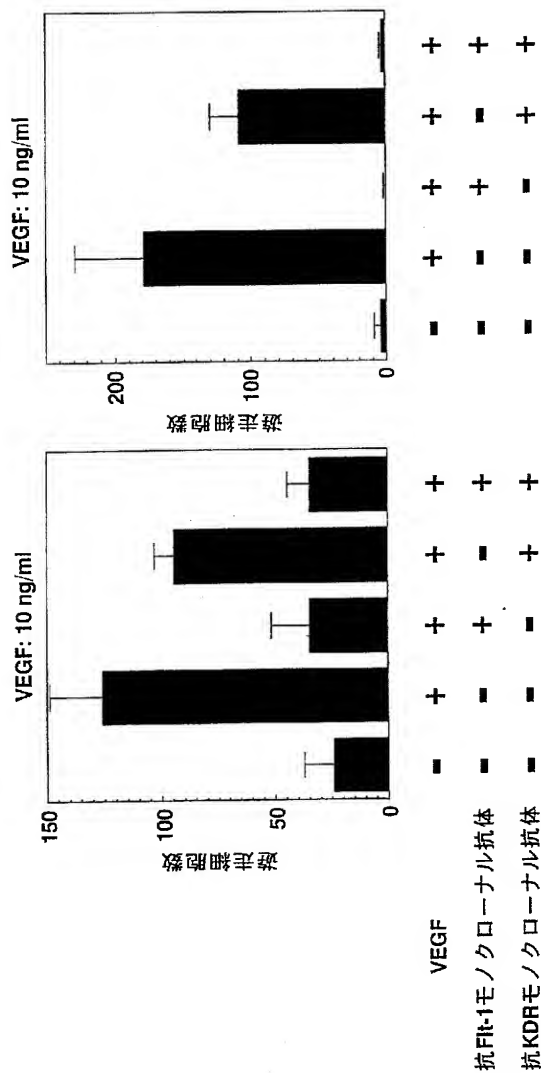
13. KDR 受容体からの情報伝達を阻害する物質が、KDR チロシンキナーゼ阻害活性を有する物質および ERK 阻害活性を有する物質から選ばれる請求の範囲 10 記載の薬剤。

14. ヒト VEGF 受容体 Flt-1 アンタゴニストとヒト VEGF 受容体 KDR アンタゴニストとを含む医薬。

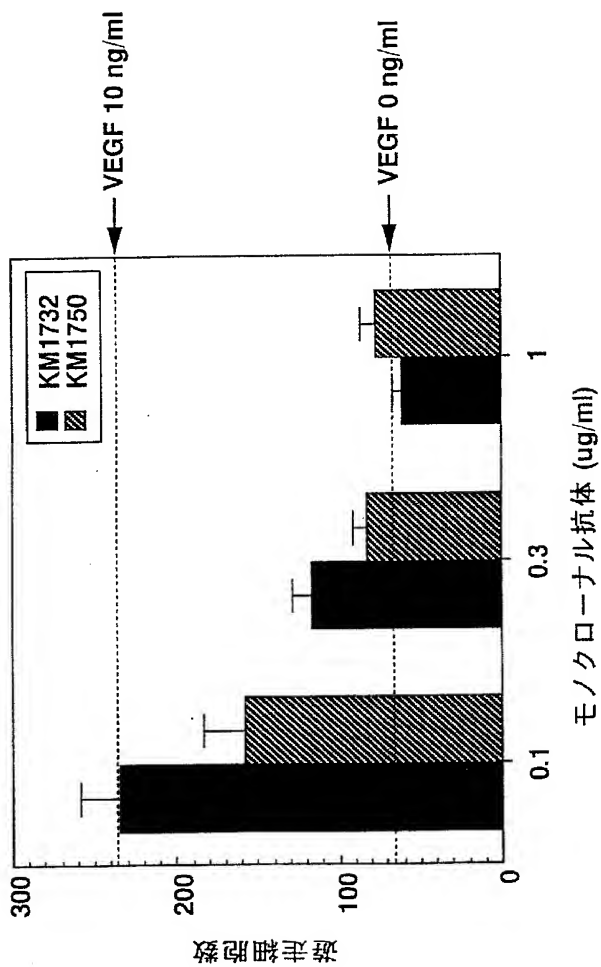
第 1 図



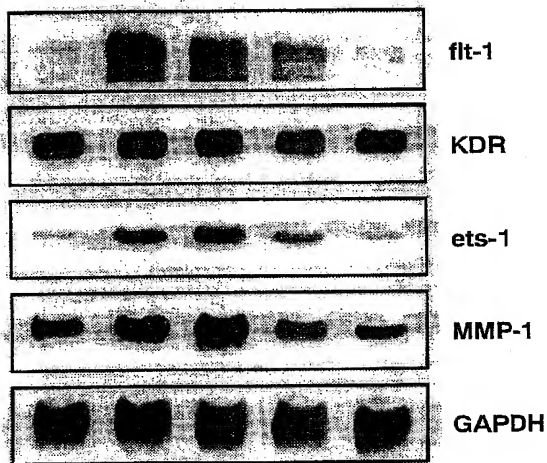
第 2 図



第 3 図

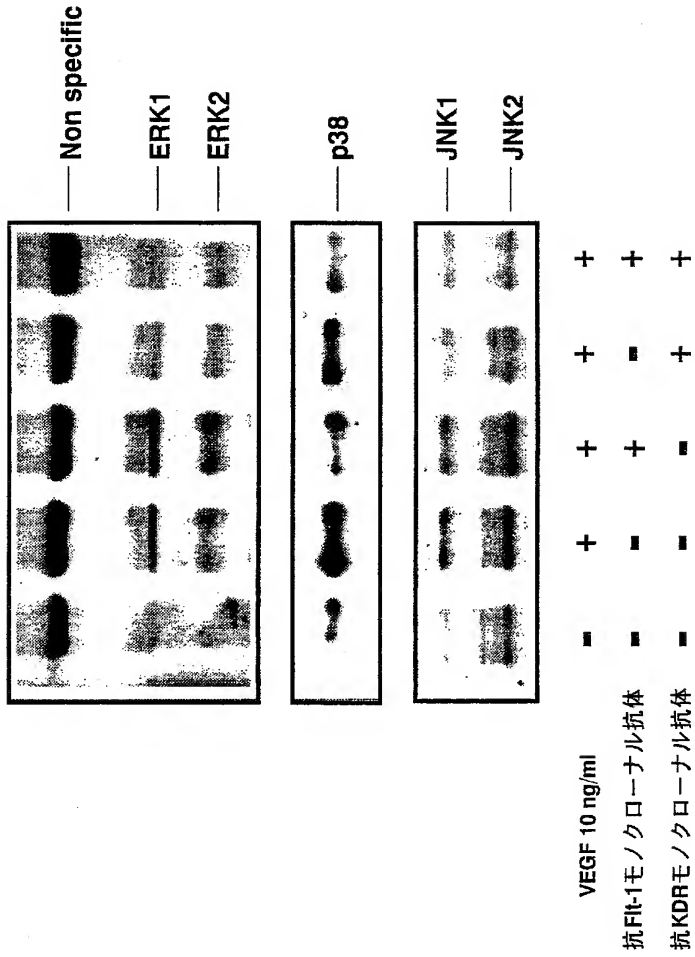


## 第 4 図

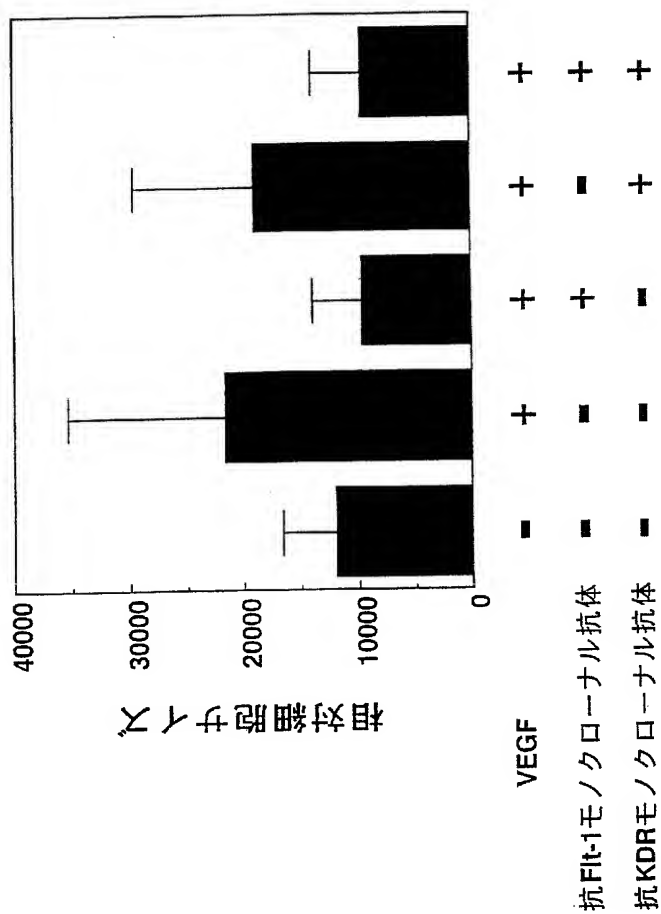


VEGF	-	+	+	+	+
抗Flt-1モノクローナル抗体	-	-	+	-	+
抗KDRモノクローナル抗体	-	-	-	+	+

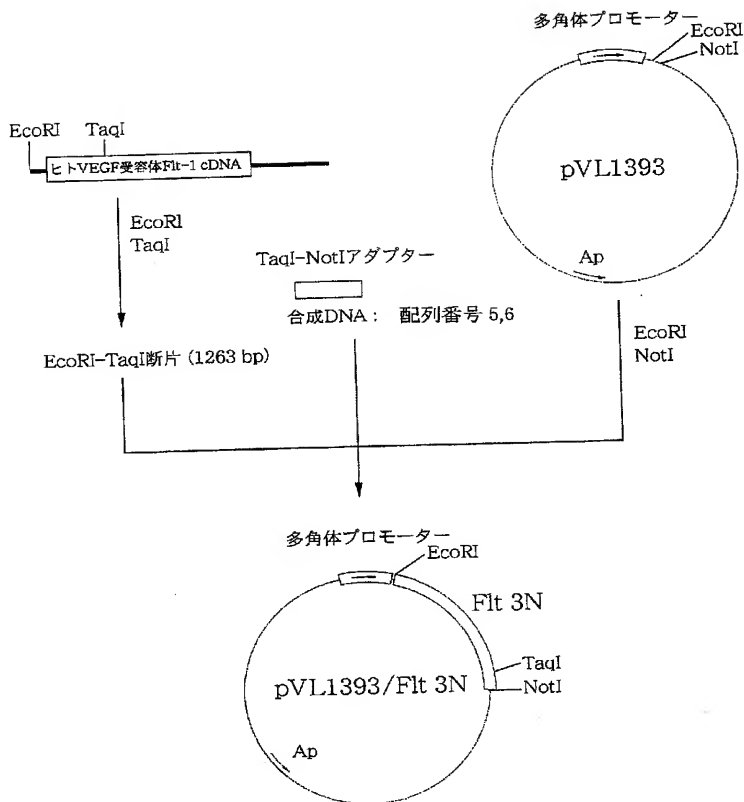
第 5 図



第 6 図

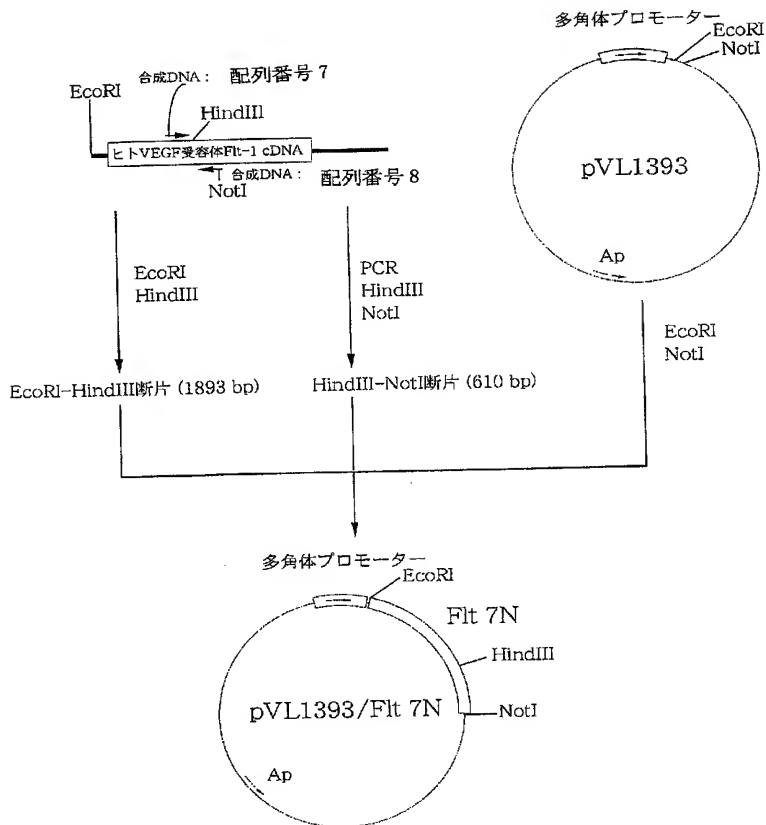


## 第 7 図

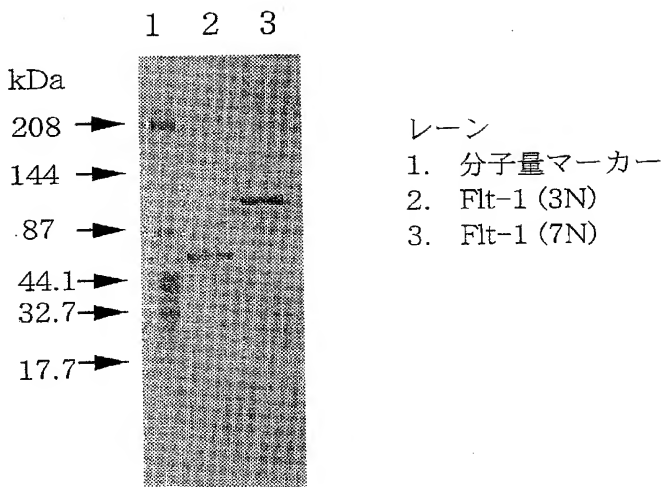




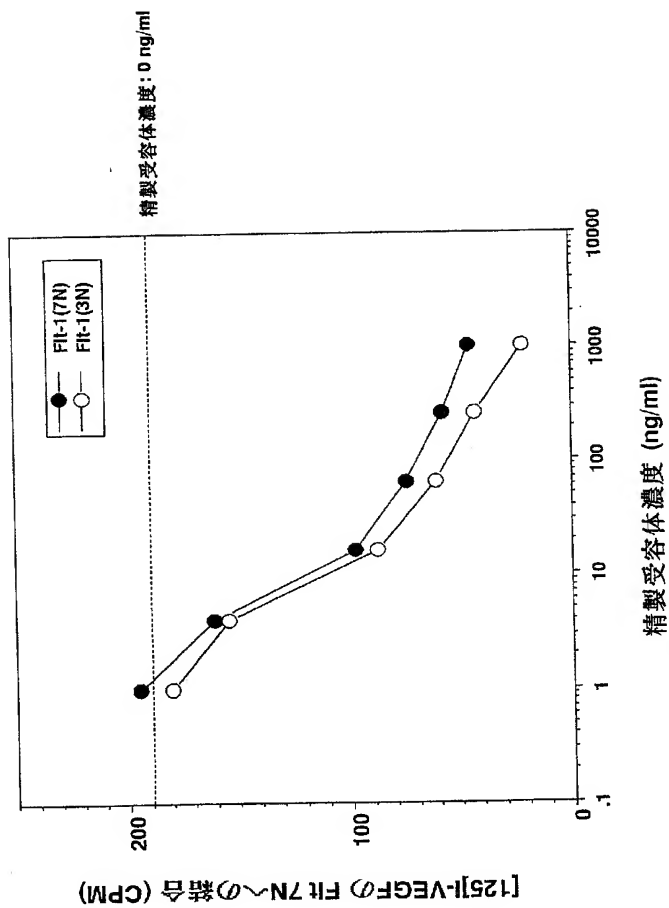
## 第 8 図



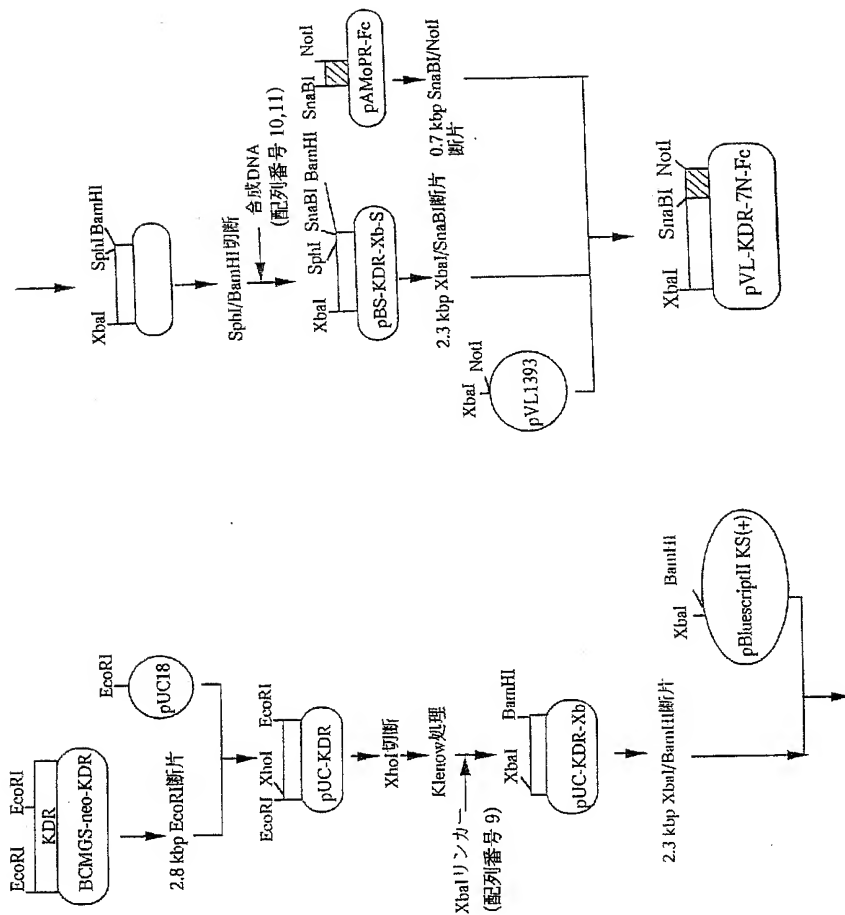
## 第 9 図



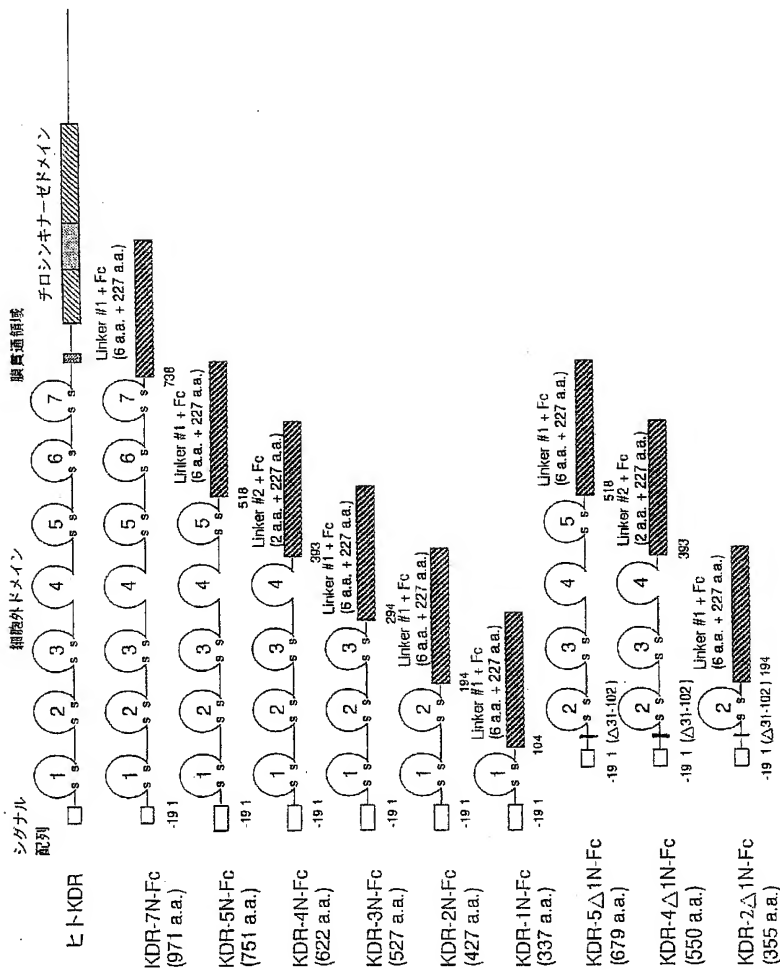
## 第 10 図



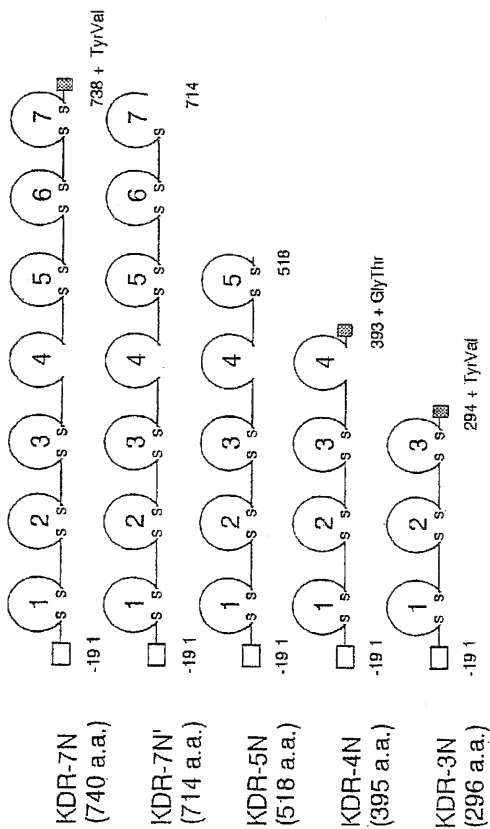
## 第 11 図



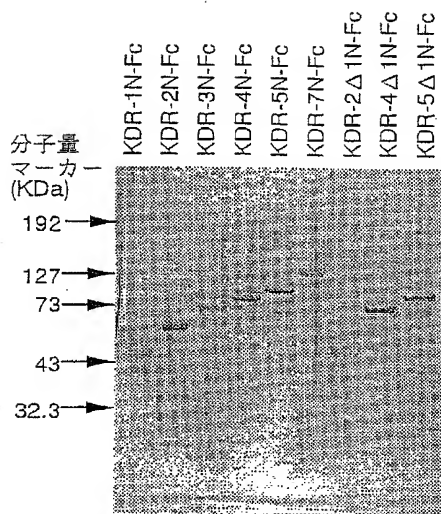
第 12 図



## 第 13 図



## 第 14 図



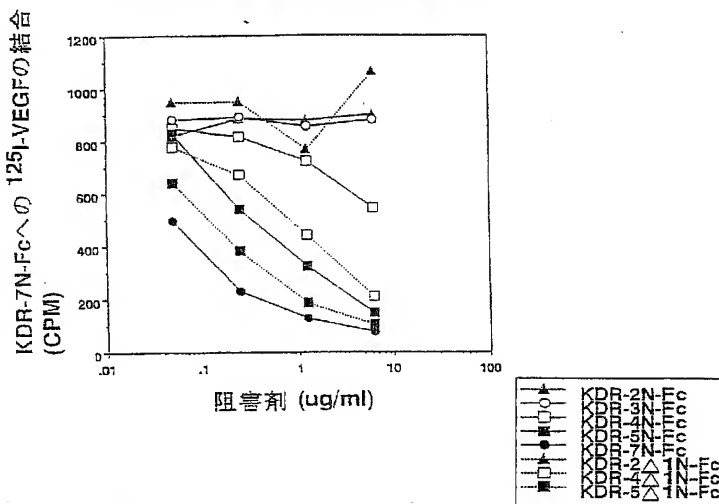
還元条件

2ug タンパク/レーン

## 第 15 図

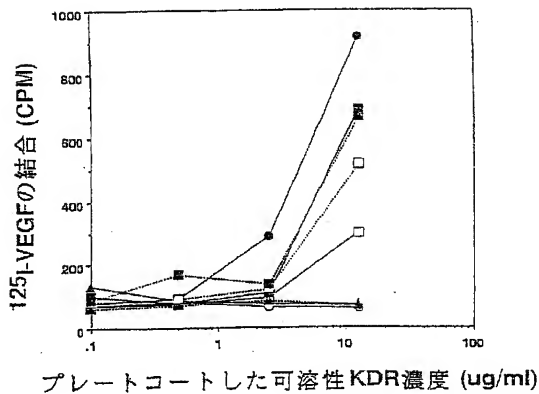
A

可溶性KDR誘導体の競合阻害活性



B

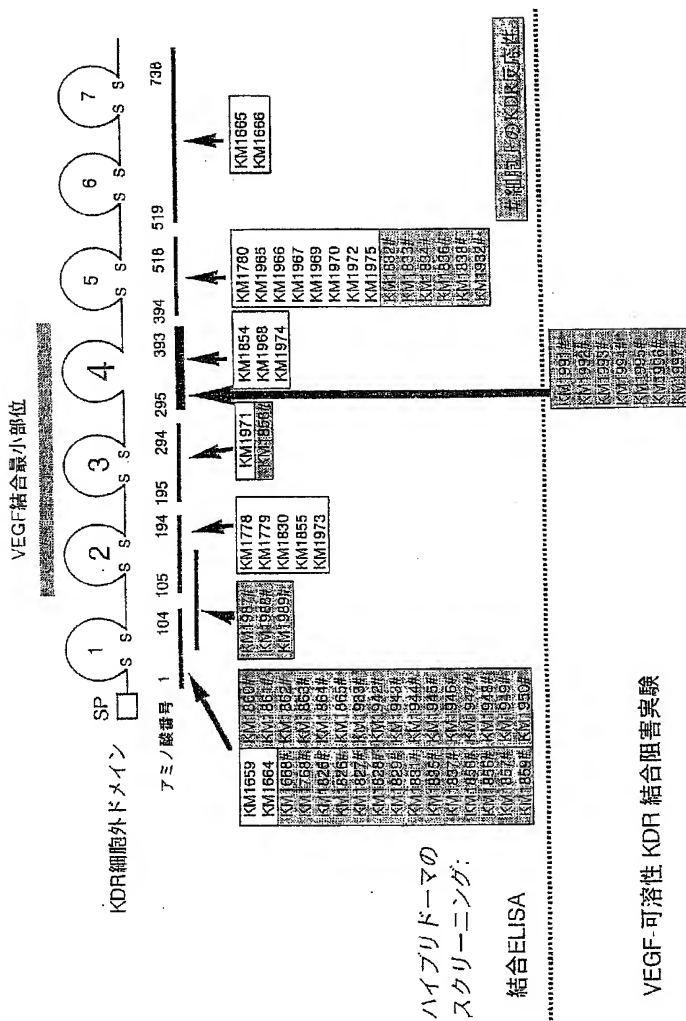
可溶性KDR誘導体のVEGF結合活性



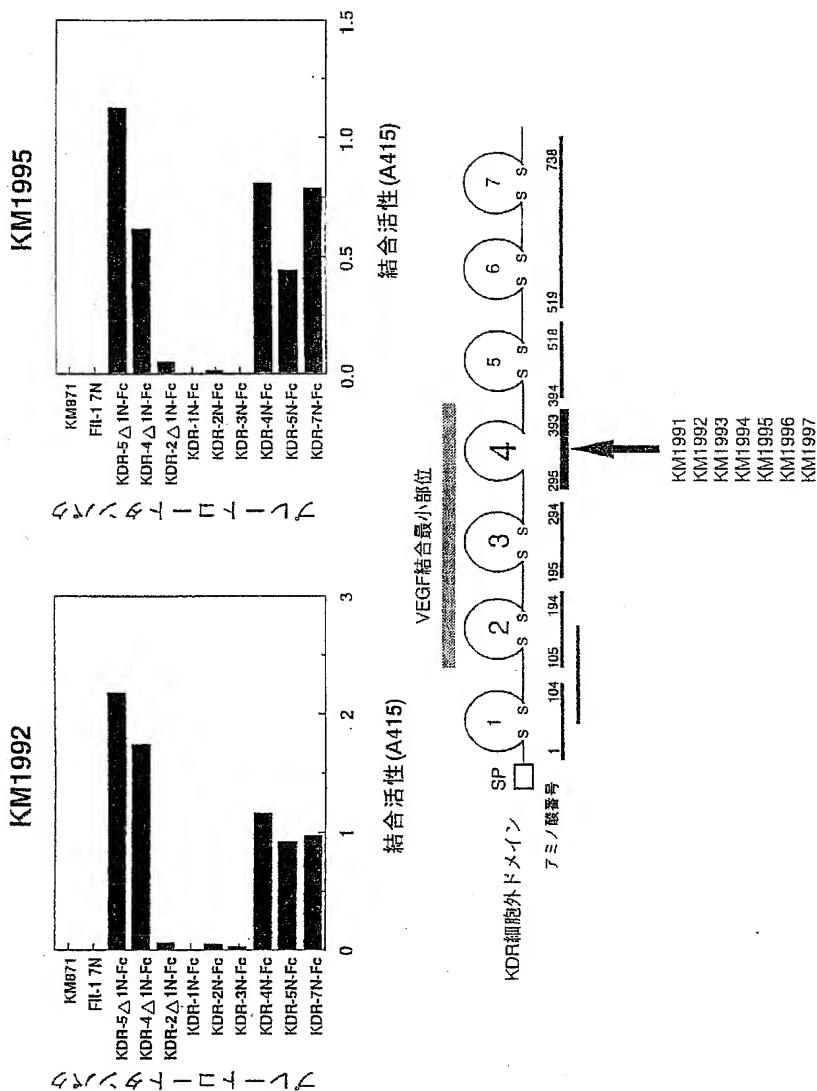




第 17 図



第 18 図



## SEQUENCE LISTING

<110> KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD

<120> VEGF receptor inhibitor

<130> 11140WO

<140>

<141>

<150> H10-138999

<151> 1998-05-20

<160> 35

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 1

aggggaactg aagacaggct a

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 2

gatgctccaa ggtcaggaag t

21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 3

gaaatggatg gctcccgaa t

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 4

caggtgaagc gcttcagcat

20

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 5

cgacaaacca atataatcta agc

23

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 6

ggccgcttag attatattgg titgt

25

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 7

.ggaatctaca ttgcatagc t

21

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 8

ttatgcggcc gcttatcctt gaacagtgag gta

33

<210> 9

<211> 8

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 9

ctctagag

8

<210> 10

<211> 60

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 10

cagtgttctt ggctgtgcaa aaagtggagg catttttcat aatagaaggt gcctacgtag 60

<210> 11

<211> 67

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 11

gacccacgt aggcaccttc tattatgaaa aatgcctcca cttttgcaca gccaagaaca 60

ctgcatg

67

<210> 12

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 12

gatcatggag cttaagaatg catccttgca gg

32

<210> 13

<211> 36

<212> DNA



<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 13

acgctctagg actgttacgt acctgaccac gcaatg

36

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 14

aacaaagtcg ggtacgtata atgagc

26

<210> 15

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 15

ggccgctcat tatacgtacc cgactttgtt

30

<210> 16

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 16

ctgttggaga aaagcttgtc ttaaattg

28

<210> 17

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 17

atacacaacc aggtaccca catggctctg ct

32

<210> 18

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 18

caaggattgt acacctgtgc agcatccagt gggctgtacg tagc

44

<210> 19

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 19

ggccgctacg tacagccac tggatgctgc acaggtgtac aatc

44

<210> 20

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 20

taatgatgaa agttaccagt ctattatgta cgtagc

36

<210> 21

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 21

ggccgctacg tacataatag actggtaact ttcatcat

38

<210> 22

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 22

gatcttacgt agc

13

<210> 23

<211> 13

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 23

ggccgctacg taa

13

<210> 24

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 24

atcccggtgta ctttctagag tcgaggt

27

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

&lt;400&gt; 25

tgtccctgc aagtagatct aagagttgta

30

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 26

gtataatgag cggccgcg

18

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 27

gatccgcggc cgctcattat ac

22

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 28

ctaattgagcg gccgcgcatg

20

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 29

cgcgccgct cattag

16

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 30

aacaaagtcg ggtacgtata atgagc

26

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthetic DNA

&lt;400&gt; 31

ggcgcgtcat tatacgtacc cgactttggt

30

<210> 32

<211> 9

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 32

ctaatgagc

9

<210> 33

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 33

ggcgcgtcat taggtac

17

<210> 34

<211> 738

<212> PRT

<213> Human

<400> 34

Ala Ser Val Gly Leu Pro Ser Val Ser Leu Asp Leu Pro Arg Leu Ser

1

5

10

15

Ile Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Lys Ala Asn Thr Thr Leu Gln Ile

	20		25		30
Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro Asn Asn Gln					
	35		40		45
Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr Glu Cys Ser Asp Gly Leu					
	50		55		60
Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val Ile Gly Asn Asp Thr Gly					
	65		70		75
					80
Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser Val Ile Tyr					
		85		90	95
Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser Val Ser Asp					
	100		105		110
Gln His Gly Val Val Tyr Ile Thr Glu Asn Lys Asn Lys Thr Val Val					
	115		120		125
Ile Pro Cys Leu Gly Ser Ile Ser Asn Leu Asn Val Ser Leu Cys Ala					
	130		135		140
Arg Tyr Pro Glu Lys Arg Phe Val Pro Asp Gly Asn Arg Ile Ser Trp					
	145		150		155
					160
Asp Ser Lys Lys Gly Phe Thr Ile Pro Ser Tyr Met Ile Ser Tyr Ala					
		165		170	175
Gly Met Val Phe Cys Glu Ala Lys Ile Asn Asp Glu Ser Tyr Gln Ser					
	180		185		190
Ile Met Tyr Ile Val Val Val Val Gly Tyr Arg Ile Tyr Asp Val Val					
	195		200		205
Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val					
	210		215		220



Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn  
 225 230 235 240

Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg  
 245 250 255

Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr  
 260 265 270

Leu Thr Ile Asp Gly Ile Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys  
 275 280 285

Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg  
 290 295 300

Val His Glu Lys Pro Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met Glu Ser Leu  
 305 310 315 320

Val Glu Ala Thr Val Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala Lys Tyr Leu  
 325 330 335

Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly Ile Pro Leu  
 340 345 350

Glu Ser Asn His Thr Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr Ile Met Glu  
 355 360 365

Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu Thr Asn Pro  
 370 375 380

Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val Ser Leu Val Val Tyr Val  
 385 390 395 400

Pro Pro Gln Ile Gly Glu Lys Ser Leu Ile Ser Pro Val Asp Ser Tyr  
 405 410 415

Gln Tyr Gly Thr Thr Gln Thr Leu Thr Cys Thr Val Tyr Ala Ile Pro  
 420 425 430

Pro Pro His His Ile His Trp Tyr Trp Gln Leu Glu Glu Glu Cys Ala  
 435 440 445

Asn Glu Pro Ser Gln Ala Val Ser Val Thr Asn Pro Tyr Pro Cys Glu  
 450 455 460

Glu Trp Arg Ser Val Glu Asp Phe Gln Gly Gly Asn Lys Ile Glu Val  
 465 470 475 480

Asn Lys Asn Gln Phe Ala Leu Ile Glu Gly Lys Asn Lys Thr Val Ser  
 485 490 495

Thr Leu Val Ile Gln Ala Ala Asn Val Ser Ala Leu Tyr Lys Cys Glu  
 500 505 510

Ala Val Asn Lys Val Gly Arg Gly Glu Arg Val Ile Ser Phe His Val  
 515 520 525

Thr Arg Gly Pro Glu Ile Thr Leu Gln Pro Asp Met Gln Pro Thr Glu  
 530 535 540

Gln Glu Ser Val Ser Leu Trp Cys Thr Ala Asp Arg Ser Thr Phe Glu  
 545 550 555 560

Asn Leu Thr Trp Tyr Lys Leu Gly Pro Gln Pro Leu Pro Ile His Val  
 565 570 575

Gly Glu Leu Pro Thr Pro Val Cys Lys Asn Leu Asp Thr Leu Trp Lys  
 580 585 590

Leu Asn Ala Thr Met Phe Ser Asn Ser Thr Asn Asp Ile Leu Ile Met  
 595 600 605

Glu Leu Lys Asn Ala Ser Leu Gln Asp Gln Gly Asp Tyr Val Cys Leu  
 610 615 620

Ala Gln Asp Arg Lys Thr Lys Lys Arg His Cys Val Val Arg Gln Leu

625                                      630                                      635                                      640

Thr Val Leu Glu Arg Val Ala Pro Thr Ile Thr Gly Asn Leu Glu Asn  
645                                      650                                      655

Gln Thr Thr Ser Ile Gly Glu Ser Ile Glu Val Ser Cys Thr Ala Ser  
660                                      665                                      670

Gly Asn Pro Pro Pro Gln Ile Met Trp Phe Lys Asp Asn Glu Thr Leu  
675                                      680                                      685

Val Glu Asp Ser Gly Ile Val Leu Lys Asp Gly Asn Arg Asn Leu Thr  
690                                      695                                      700

Ile Arg Arg Val Arg Lys Glu Asp Glu Gly Leu Tyr Thr Cys Gln Ala  
705                                      710                                      715                                      720

Cys Ser Val Leu Gly Cys Ala Lys Val Glu Ala Phe Phe Ile Ile Glu  
725                                      730                                      735

Gly Ala  
738

<210> 35

<211> 19

<212> PRT

<213> Human

<400> 35

Met Gln Ser Lys Val Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Leu Cys Val Glu  
1                                      5                                      10                                      15

Thr Arg Ala  
19

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02660

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.<sup>6</sup> A61K45/06, 39/395 // A61K31/35, 31/40, 31/44

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.<sup>6</sup> A61K45/06, 39/395 // A61K31/35, 31/40, 31/44

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 95/21868, A1 (IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED), 17 August, 1995 (17. 08. 95), Reference as a whole (particularly Claim 4 ; page 12, line 18 to page 26, line 12) & US, 5840301, A & US, 5861499, A & US, 5874542, A & EP, 741748, A1	1-8, 10-12, 14
Y	WO, 97/15662, A2 (RIBOZYME PHARMACEUTICALS), 1 May, 1997 (01. 05. 97), Page 2, line 33 to page 3, line 5 ; page 5, line 23 to page 6, line 7 ; page 18, lines 6 to 25 (Family: none)	1-14
Y	WO, 97/34920, A1 (SUGEN, INC.), 25 September, 1997 (25. 09. 97), Page 33, lines 3 to 39, particularly Table II (Family: none)	9, 13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search  
27 July, 1999 (27. 07. 99)Date of mailing of the international search report  
10 August, 1999 (10. 08. 99)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/02660

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ROUSSEAU, Simon et al., p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells, Oncogene, 1997, Vol. 15, pp.2169-2177 Reference as a whole	9, 13

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> A61K45/06, 39/395//A61K31/35, 31/40, 31/44

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>8</sup> A61K45/06, 39/395//A61K31/35, 31/40, 31/44

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 95/21868, A1 (IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED) 17. 8月. 1995 (17. 08. 95) 文献全体、特に、 CLAIM4, 第12ページ第18行-第26ページ第12行 &US, 5840301, A&US, 5861499, A &US, 5874542, A&EP, 741748, A1	1-8, 10-12, 14
Y	WO, 97/15662, A2 (RIBOZYME PHARMACEUTICALS) 01. 5月. 1997 (01. 05. 97) 第2ページ第33行- 第3ページ第5行、第5ページ第23行-第6ページ第7行、第1 8ページ第16-25行 ファミリーなし	1-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「I」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 07. 99

国際調査報告の発送日

10.08.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

神下 浩一

4C

9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 97/34920, A1 (SUGEN, INC.) 25. 9月. 97 (25. 09. 97) 第33ページ第3行-第39ページ、特に、 TABLE II ファミリーなし	9, 13
Y	ROUSSEAU, Simon et al, p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells, Oncogene, 1997, Vol. 15, pp. 2169-2177 文献全体	9, 13